

**Untersuchungen
über die Schutzfunktion
von Carotinoiden
gegenüber UV-B-Strahlung
bei *Fusarium aquaeductuum***

Luitgardis Seigner

Disbui. München

1988

Untersuchungen über die Schutzfunktion von
Carotinoiden gegenüber UV-B-Strahlung bei
Fusarium aquaeductuum

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Diplom Biologin
Luitgardis Seigner
aus Landshut

August 1988

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Rau
2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Schmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Oktober 1988

Meiner Mutter

Meiner Tante

Verwendete Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
Butyl-PBD	2-(4-t-Butylphenyl)-5-(4-biphenyl)- 1,2,3-oxodiazol
Belichtung	Belichtung mit Blaulicht
Bestrahlung	Bestrahlung mit UV-B
Mutante car "m1202"	Mutante car "München 1202"
cpm	counts per minute
DTT	Dithiothreitol
FS	Fettsäure
M	Molar
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
N.xanthin	Neurosporaxanthin
poly-A	poly-Adenosin
rel. Einheiten	relative Einheiten
rd-Mutante	red-dark-Mutante
TCA	Trichloressigsäure
TGW	Trockengewicht
m-RNA	messenger-RNA
t-RNA	transfer-RNA
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl
upm	Umdrehungen pro Minute



Digitized by the Internet Archive
in 2026

GLIEDERUNG

Seite:

I. Einleitung	1
II. Material und allgemeine Methoden	13
1. Pilzmaterial und Anzucht	13
2. Versuchsdurchführung.....	14
2.1. Myzelernte, Überführung in Minimal- medium und Akkommodation.....	14
2.2. Belichtung.....	15
2.2.1. Verwendete Lichtquellen und Filter..	15
2.2.1.1. Blaulicht.....	15
2.2.1.2. UV-B.....	16
2.2.2. Die Belichtung mit Blaulicht.....	17
2.2.3. Die Bestrahlung mit UV-B.....	17
2.3. Bestimmung der Atmung nach Warburg.....	18
3. Analyse der Carotinoide.....	18
3.1. Extraktion der Carotinoide.....	18
3.2. Bestimmung der Gesamtmenge an gefärbten Carotinoiden.....	19
3.3. Auftrennung in neutrale und saure Carotinoide.....	20
3.4. Chromatographie von Carotinoidlösungen.....	21
3.4.1. Säulenchromatographie zur Auf- trennung gefärbter Carotinoide.....	21
3.4.2. Dünnschichtchromatographie zur Auftrennung gefärbter Carotinoide...	22
3.4.3. Säulenchromatographie zur Auftrennung von im UV-Bereich absorbierenden Carotinoiden.....	23

3.5. Mengenbestimmung der einzelnen Carotinoide.	24
3.5.1. Computergestützte Multikomponenten- analyse (MKA) des epiphasischen..... Carotinoidgemisches.....	24
3.5.2. Bestimmung von Neurosporaxanthin....	24
3.5.3. Bestimmung von Phytoen und Phytofluen	24
3.5.4. Berechnung der Mengen an Carotinoiden	25
III. Spezielle Methodik.....	26
1. Bestimmung von Aufnahme und Einbau von radioaktiv markiertem ^{35}S -L-Methionin.....	26
1.1. Versuchsdurchführung.....	26
1.2. Bestimmung des gesamten ins Myzel aufgenommenen ^{35}S -L-Methionins.....	26
1.3. Bestimmung der Menge an eingebautem ^{35}S -L-Methionin.....	27
1.4. Bestimmung der Menge an im Medium vorhandenem ^{35}S -L-Methionin.....	27
2. Analyse der Lipide.....	28
2.1. Analyse des Lipidgemisches aus dem gesamten Myzel.....	28
2.1.1. Lipidextraktion.....	28
2.1.2. Qualitative Bestimmung der Phospholipide.....	29
2.1.3. Bestimmung von Sterinen.....	29
2.1.3.1. Säulenchromatographie.....	29
2.1.3.2. Liebermann-Burchard-Test..	30
2.2. Analyse der Fettsäurezusammensetzung der.. Membran.....	30
2.2.1. Gewinnung der Membranfraktion.....	30
2.2.2. Extraktion der Lipide.....	31
2.2.3. Gaschromatographische Auftrennung der Fettsäuren.....	31

IV. Ergebnisse.....	32
1. Einige Charakteristika der Photoregulation und Carotinoidgehalt.....	32
1.1. Akkumulationskinetik der Carotinoide.....	32
1.1.1. Die Mutante car "m1202".....	34
1.1.2. Die Mutante car "m1009".....	34
1.2. Carotinoidmenge unterschiedlich lang belichteter Proben (Dosis-Effekt-Kurve)....	36
1.2.1. Die Mutante car "m1202".....	36
1.2.2. Die Mutante car "m1009".....	38
1.3. Pigmentzusammensetzung im Dunkeln und nach Belichtung.....	38
1.3.1. Die Mutante car "m1202".....	38
1.3.2. Die Mutante car "m1009".....	42
1.3.3. Die Mutante rd-1.....	42
2. Phototoxische Wirkung von UV-B-Strahlung auf Wildstamm und Mutanten von <i>Fusarium aquaeductum</i>	45
2.1. Vergleich der Empfindlichkeit von Wildstamm und Mutanten für UV-B-Strahlung.....	46
2.2. Einfluß einer Blauvorbelichtung auf die Reaktion auf UV-B-Strahlung.....	47
2.2.1. Wildstamm.....	50
2.2.2. Die Mutante car "m1202".....	54
2.2.3. Die Mutante rd-1.....	60
2.3. Phototoxische Wirkung von UV-B-Strahlung auf Carotinoidsynthesefähigkeit und Atmung in Abhängigkeit von der Akkommodationsdauer	68
2.3.1. Die Mutante rd-1.....	70
2.3.2. Wildstamm.....	74
2.3.3. Die Mutante car "m1009".....	77
2.4. Phototoxische Wirkung von UV-B-Strahlung auf Aufnahme und Einbau von radioaktiv- markiertem L-Methionin in Abhängigkeit von der Akkommodationsdauer.....	81



2.5. "Regenerationsvermögen" des Pilzes nach schadigender Bestrahlung mit UV-B.....	87
3. Lipidanalyse belichteter und unbelichteter Proben von Wildstamm und Mutanten.....	92
3.1. Phospholipidzusammensetzung bei Wildstamm und Mutanten.....	92
3.2. Fettsaurezusammensetzung der Membran- fraktion des Wildstammes.....	94
3.3. Steringehalt belichteter und unbelichteter Proben des Wildstammes und der Mutanten...	96
V. Diskussion.....	98
VI. Zusammenfassung.....	115
VII. Literatur.....	121

I. EINLEITUNG

Licht ist ein wichtiger Umweltfaktor, der Pflanzen, Mikroorganismen und Tiere in vielfältiger Weise beeinflusst. Es ist nicht nur primäre Energiequelle für photolithotrophe und photoorganotrophe Organismen, sondern spielt auch als induzierender, modulierender und modifizierender Faktor eine entscheidende Rolle bei der Steuerung der Entwicklung vieler Lebewesen, vor allem bei der von Pflanzen. Voraussetzung für das gezielte Eingreifen von Licht in physiologische Prozesse ist die Perzeption von Lichtquanten durch einen Photorezeptor. Eine wichtige Rolle spielt das Phytochrom, welches eine große Anzahl rotlicht-abhängiger Reaktionen steuert (Mohr et al., 1974), so z.B. auch die Carotinoidsynthese bei *Sinapis alba* L. (Schnarrenberger und Mohr, 1970; Frosch und Mohr, 1980). Die Identität des Photorezeptors, welcher UV und Blaulicht perzipiert (Cryptochrom), ist noch ungeklärt. Auf Grund des Wirkungsspektrums werden jedoch Flavine bzw. Flavoproteine und Carotinoide diskutiert (Lit. siehe Song, 1980; Shropshire, 1980; Reger, 1988).

Die Carotinoidsynthese von *Fusarium aquaeductum* ist strikt photoreguliert und wird über das Cryptochrom gesteuert (Rau, 1967); sie ist sauerstoff- und temperaturabhängig (Rau, 1962). Die Photoinduktion ist die Primärreaktion einer Kausalkette, die sich in drei zeitlich voneinander abgrenzbare Teilprozesse gliedern läßt (Rau, 1967b; Theimer und Rau, 1970; Bindl, Lang und Rau, 1970). Folge der Induktion ist das Auftreten einer spezifischen poly-A-haltigen RNA-Fraktion (Schrott und Rau, 1977), die eventuell die m-RNA darstellt, die zur Bildung des carotinoidsynthetisierenden Enzymsystems führt. Die Enzymsynthese, der zweite Schritt der Reaktionskette, ist lichtunabhängig, temperatur- und sauerstoffabhängig (Rau, 1969). Da die Applikation des Translationshemmstoffes Cycloheximid bei *Fusarium aquaeductum* drei Stunden nach Belichtung die Carotinoidsynthese nahezu unbeeinflusst läßt (Rau und Rau-Hund, 1977), wird angenommen, daß die Enzymsynthese nach diesem

Zeitraum beendet ist.

Die Bildung der Carotinoide stellt den letzten Schritt der Kausalkette dar. Schon nach 30- bis 40-minütiger lag-Phase sind Carotinoide meßbar; nach ca. 14 Stunden ist, bei der im Kapitel "Material und allgemeine Methoden" beschriebenen Anzuchtmethode, die Carotinoidsynthese abgeschlossen (Abb.4). Die Menge der dabei synthetisierten Pigmente ist abhängig von der eingestrahlten Lichtdosis (Abb.8); Lichtdosen bis zu $5 \times 10^4 \text{ Jm}^{-2}$ führen dabei zu keiner Sättigung der Reaktion (Theimer, 1968). Zur besseren Übersicht ist in Abb.1 der mögliche Biosyntheseweg der Carotinoide bei *Fusarium aquaeductum* dargestellt.

Die Funktion der Carotinoide bei *Fusarium aquaeductum* ist noch weitgehend ungeklärt. Allgemein gelten Carotinoide als wichtige Moleküle, welche in der Lage sind, Organismen vor Schädigungen durch Licht zu schützen (s.u.). Derartigen Substanzen und vor kurzweiliger Strahlung schützenden Mechanismen kommt gerade im Zusammenhang mit der derzeit diskutierten Abnahme der vor UV-Strahlung schützenden, stratosphärischen Ozonschicht besondere Bedeutung zu (Cutchis, 1974; Hammond und Maugh, 1974; Lit. siehe NAS, 1984). Verantwortlich für den Ozonabbau sind durch anthropogene Einflüsse entstandene Radikale: Stickoxide, die besonders aus industriellen Tätigkeiten stammen (Grobeck et al., 1974), Chlor und Chloroxide, entstanden durch Zerlegung von Fluorchlorkohlenwasserstoffen, die weltweit als Kältemittel, Treibgase und Schaummittel eingesetzt werden (Molina und Rowland, 1974), durch UV in der Stratosphäre, Hydroxyl- und Methylradikale (Rowland, 1982). Ein Abbau der Ozonschicht würde vor allem zu einer Zunahme der UV-B-Strahlung (280-320nm; Lockhard und Brodführer-Franzgrote; 1961) führen, die auf die Erdoberfläche auftrifft, da Ozon im UV-B-Bereich die größte Absorption aufweist (Griggs, 1968); der Anteil der UV-C-Strahlung (200-280nm), welche uns praktisch nicht erreicht, und der Anteil der UV-A-Strahlung (320-400nm), welche nur in geringem Maße von Ozon absorbiert wird, bleibt nahezu unverändert. Die extraterrestrische UV-Strahlung ist zwar mit einem Anteil von ca. 8,7% an der Gesamtstrahlung

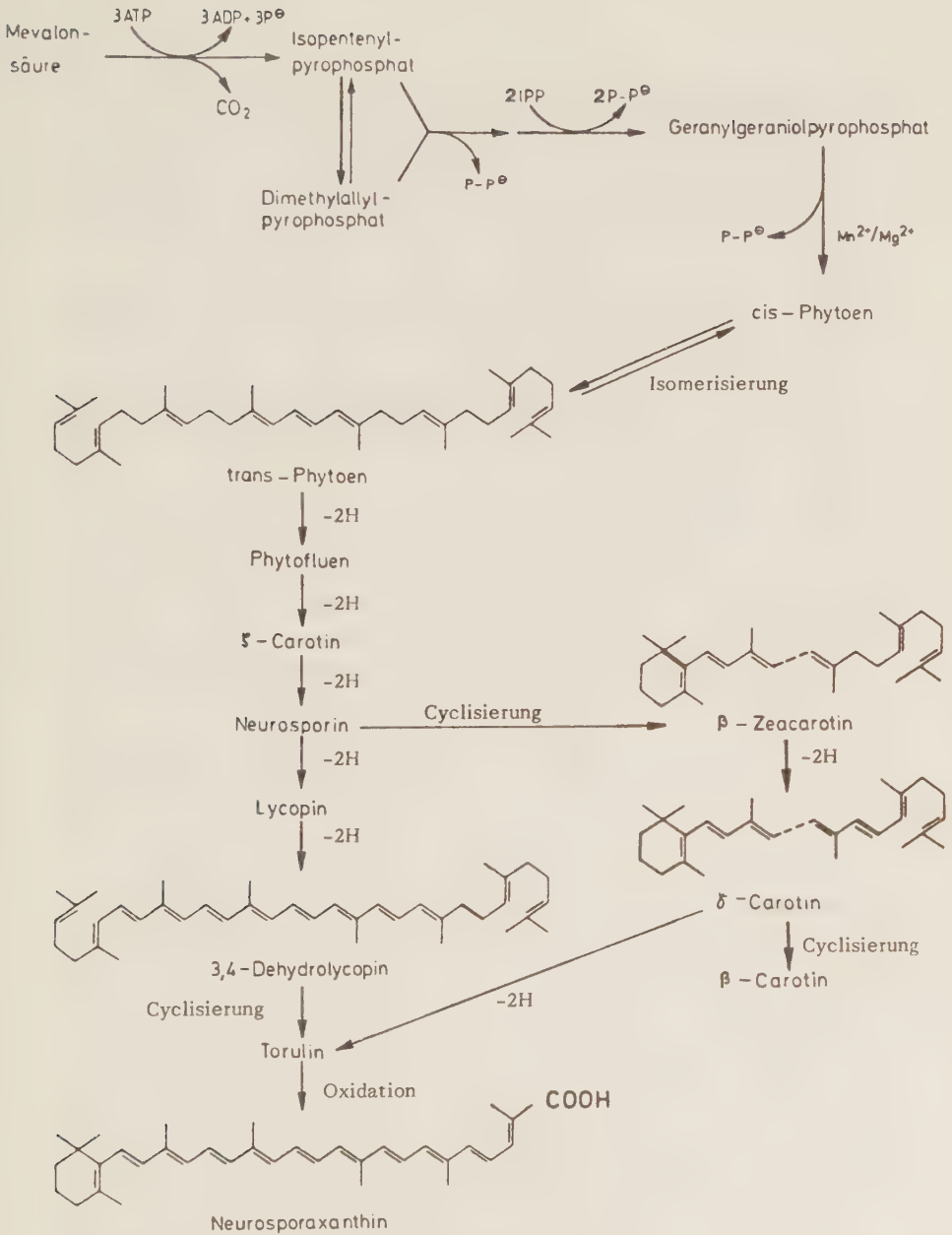


Abb. 1 :

absolut gesehen nicht sehr bedeutsam; kurzwellige elektromagnetische Strahlung ist jedoch biologisch äußerst effektiv (Lit. siehe Tevini und Iwanzik, 1982). Dies erklärt die außerordentliche Bedeutung des Ozons, das als Filter nur ca. 23% der extraterrestrischen UV-B-Strahlung und nur ca. 72% der UV-A-Strahlung durch die Stratosphäre auf die Erdoberfläche gelangen läßt.

In welcher Weise könnte eine erhöhte Bestrahlungsstärke von UV-B Organismen schädigen? Besitzen Organismen Möglichkeiten sich gegen eine schädigende Wirkung zu schützen? Dazu sollen im folgenden zunächst die wichtigsten Erkenntnisse über phototoxische Wirkungen und Schutzmechanismen für Strahlung im allgemeinen dargestellt werden.

Sichtbares Licht kann bei hoher Intensität phototoxische Effekte auslösen oder sogar zur Abtötung eines Organismus führen (Webb, 1977). Im Gegensatz zur Schädigung durch UV-C- (280-200nm), Röntgen- und γ -Strahlung (<200nm) ist für die toxische Wirkung der übrigen spektralen Bereiche Sauerstoff notwendig (photodynamische Schädigung) (Blum, 1941). Voraussetzung für eine Schädigung ist das Vorhandensein eines (exo- oder endogenen) Moleküls, welches die Strahlung absorbiert (Lit. siehe Krinsky, 1979). In diesem Zusammenhang sind vor allem die endogen stets vorhandenen Komponenten Nukleinsäuren und Proteine, die bei 260nm und bei 280nm ihre größte Absorption besitzen (McLaren and Shugar, 1964; Davidson, 1976) von großer Bedeutung. Das Wirkungsspektrum für die Abtötung von *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* (Lit. siehe Jagger, 1985) ist nahezu mit dem Absorptionsspektrum der DNA identisch. Als weitere endogene Moleküle werden u. a. Thiouridin als Bestandteil bestimmter procaryotischer t-RNA-Spezies, Menachinon, Pyridoxalphosphat, Riboflavine, Protein B2 der Ribonukleotidreduktase (Lit. siehe Jagger, 1985), Membrankomponenten (Murphy, 1983) und verschiedene Phytohormone wie z.B. IES (Wellmann et al., 1986) diskutiert. Endogene Sensibilisatoren (z.B. Porphyrine, Chlorophylle) (Lit. siehe Giese, 1971; Mathews-Roth, 1984) und exogene Sensibilisatoren (z.B. Methylenblau, Toluidinblau) erreichen durch Absorption eines

Lichtquants einen energiereichen, angeregten Zustand, den sog. Singlet-Zustand (Lebensdauer etwa 10^{-11} sec); nach Fluoreszenz, nach Energieabgabe durch inter-system-crossing oder durch Abgabe von Wärme entsteht der langlebigere Triplett-Zustand (10^{-4} sec) des Moleküls. Die Rückkehr auf den Grundzustand erfolgt entweder durch Phosphoreszenz oder durch Abgabe von Energie an andere Moleküle, welche dadurch entweder durch Redoxprozesse zu reaktionsfähigen Radikalen werden (Typ I-Reaktion) oder in ihren angeregten Zustand übergehen (Typ II-Reaktion). Sehr oft ist in diese Vorgänge Sauerstoff involviert, der entweder als aggressiver "singlet-oxygen" oder als O_2 -Radikal (Khan, 1978) photodynamische Schädigungen verursacht.

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Diskussion lichtinduzierter Schäden ist die Frage nach dem Angriffspunkt ("target") der Strahlung. Häufig sind diejenigen Moleküle, die UV-Strahlung absorbieren, zugleich "target" für die phototoxische Wirkung des Lichtes. Besonders gut sind die lichtinduzierten Veränderungen der DNA untersucht. Neben der Bildung von Pyrimidindimeren (Tyrell, 1973; Jagger, 1976; Patrick und Rahn, 1976) und Einzelstrangbrüchen (Tyrell et al., 1974) wird auch noch das Auftreten von Pyrimidin-Addukten (Brash und Hazeltine, 1982), Pyrimidinhydraten (Jagger, 1976) und DNA-Protein-Quervernetzungen nach UV-Bestrahlung von DNA beschrieben. Rahmabhadran (1975) beschreibt eine Hemmung von DNA-, RNA- und Proteinsynthese durch Bestrahlung mit UV-A. Weitere Angriffspunkte für kurzwellige Strahlung sind die DNA-Reparatursysteme (Photoreaktivierung, Dunkelreparatur) (Tyrell, 1979), der Ribonucleosiddiphosphat-Reduktase-Komplex (Peters, 1977) und Membranen (Moss und Smith, 1981; Klamen und Tuveson, 1982; Murphy, 1983; Kelland et al., 1983; Ito und Ito, 1983; Schrott, 1985). UV-A inaktiviert z.B. die Elektronentransportkette und die oxidative Phosphorylierung, vermutlich durch Zerstörung von Isoprenoidnaphtochinon (Beyer, 1959; Brodie et al., 1979). Mathews-Roth und Krinsky (1970) fanden, daß die Veratmung von Malat sensitiv gegenüber photodynamischen Prozessen ist. Auf Membrandestruktion weisen auch

eine Reihe von Untersuchungen hin, die die Hemmung spezifischer Transportsysteme (z.B. für Aminosäuren, Zucker) durch Bestrahlung mit kurzwelligem Licht beschreiben (Sprott et al., 1975; Robb et al., 1979; Koch et al., 1976; Doyle und Kubitschek, 1976; Robb et al., 1978; Sharma und Jagger, 1981). Zusammenfassend kann gesagt werden, daß alle essentiellen Komponenten einer Zelle UV-Strahlung absorbieren und damit als Träger von Primärschäden in Frage kommen. All diese Strukturen sind zusätzlich leicht durch photochemisch gebildete Radikale angreifbar. UV stellt also einen wesentlichen abiotischen Stressfaktor dar, welcher sogar die Abtötung eines Organismus zur Folge haben kann. Im Laufe der Evolution entwickelten sich eine Reihe von Anpassungen und Schutzmechanismen gegenüber UV-Strahlung. Damit wurden die Überlebenschancen gesteigert und Leben in Biotopen mit extremem Strahlungsklima erst möglich gemacht.

Im wesentlichen können drei Faktoren genannt werden, die eine gesteigerte Toleranz gegenüber Strahlung ermöglichen:

1. Reduzierung der Strahlung, die auf den Organismus einwirkt, durch z.B. reflektierende Oberflächen, verdickte Zellwand bzw. Cuticula (Hull et al., 1975; Robberecht und Caldwell, 1980; Steinmüller und Tevini, 1985), UV-absorbierende oder reflektierende Ausscheidungen.

Besondere Bedeutung in diesem Zusammenhang kommt der durch UV-B selbst induzierbaren Bildung UV-absorbierender "Schirmpigmente" in den äußeren Zellschichten zu. So wird z.B. die UV-B-induzierte Flavonoidsynthese (Wellmann, 1975; Duell-Pfaff und Wellmann, 1982; Beggs et al., 1985) als aktive Anpassung an erhöhte Strahlung interpretiert. Auch die Rolle von Phytoen als Schirmpigment wird diskutiert (Mathews-Roth, 1983), dessen Synthese z.B. bei *Fusarium aquaeductuum* lichtinduziert ist.

2. Quenchen von durch Bestrahlung entstandenen, energiereichen Zuständen von Molekülen.

An dieser Stelle sind vor allem Carotinoide zu nennen, die die Energie eines angeregten Moleküls übernehmen können. Carotinoide mit mehr als sieben konjugierten

Doppelbindungen quenchen z.B. den Triplett-Zustand von Chlorophyll (Lit. s. Krinsky, 1968) und Carotinoide mit mehr als neun konjugierten Doppelbindungen Singlet-Sauerstoff (Foote und Denny, 1968; Mathews-Roth und Krinsky, 1970; Mathews et al., 1974). Sie können auch ein Elektron eines Radikals übernehmen und dabei selbst zu einem Radikal werden.

3. Reparatur von Strahlungsschäden der DNA.

Photoreaktivierung, Excisionsreparatur und postreplikative Reparatur sind die drei bekannten Mechanismen, die DNA-Schäden reparieren. Die Photoreaktivierung (Jagger und Stafford, 1965) wird durch das Enzym Photolyase katalysiert, das durch Bestrahlung mit Licht (340-400nm) aktiviert wird und Cyclobutanringe spaltet (Hazelton, 1983). Eine Photoreaktivierung wurde bei Bakterien und niederen Eukaryoten wie z.B. Hefen nachgewiesen. Manche Autoren postulieren auch bei höheren Pflanzen eine Photoreaktivierbarkeit; einen entsprechenden Effekt konnten Wellmann et al. (1984) für die Phytochrom-induzierte Anthocyansynthese und Beggs et al. (1985) für die durch UV-Stress ausgelöste Isoflavonoidsynthese bei *Phaseolus vulgaris* nachweisen. Im Gegensatz zur Photoreaktivierung ist für die Excisionsreparatur kein Licht nötig. Drei Enzymaktivitäten (uvr-Endonuklease, DNA-Polymerase I und Ligase) sind Voraussetzung um einen ein Dimer enthaltenden DNA-Abschnitt zu reparieren (Howard-Flanders, 1981). Beim "postreplikativen repair" ist ebenfalls das Ineinandergreifen verschiedener Genprodukte (u.a. rec A-, B-, C-Proteine) Voraussetzung, um schließlich aus Einzelstrang-DNA über den Weg der Rekombination mit einem intakten Tochter-DNA-Strang intakte Doppelstrang-DNA herzustellen (Howard-Flanders, 1981). Von großer Bedeutung ist auch das durch DNA-Schäden induzierte "SOS-System", bei dem zwölf Gengruppen (u.a. uvr-Gene, din-Gene, umu-Gene, rec-Gene) beteiligt sind. An Einzelstrang-DNA gebundenes rec-A-Protein inaktiviert durch proteolytische Spaltung den lex-A-Repressor,

welcher die Gene des "SOS-Systems" reprimiert. Dies führt zur Synthese von Proteinen, die die Reparatur von DNA-Schaden vornehmen. Dabei kommt es allerdings zu einer erhöhten Mutagenese ("error prone repair"), wofür sehr wahrscheinlich die umu-Genprodukte verantwortlich sind (Lit. siehe Knippers, 1985).

Wie hoch die Kapazität der einzelnen Mechanismen für einen Strahlungsschutz tatsächlich ist, ist nicht in jedem Fall geklärt. Eine Hemmung oder Zerstörung dieser Mechanismen würde jedoch mit Sicherheit dramatische Folgen für das Leben auf der Erde mit sich bringen.

Wie schon dargestellt wurde, werden für das Quenchen von energiereichen Molekülzuständen, die durch Strahlung entstanden sind, vor allem auch Carotinoide diskutiert.

Bei photosynthetisch aktiven Organismen bieten Carotinoide, die auch als Antennenpigmente in den Photosystemen I und II eine wichtige Rolle spielen, einen effektiven Schutz vor der chlorophyllsensibilisierten Photooxidation des Photosyntheseapparates (Kandler und Schotz, 1956; Lit. siehe Krinsky, 1968; Cogdell, 1985; Damm et al., 1985). Bei Phytoen akkumulierenden Mutanten des photoorganotrophen Bakteriums *Rhodospseudomonas sphaeroides* fanden Griffith et al. (1955) eine Zerstörung des bakteriellen Chlorophylls durch Licht. In Experimenten mit dem photosynthetisch aktiven Bakterium *Rhodospirillum rubrum*, bei dem durch Applikation von Diphenylamin die Synthese gefärbter Carotinoide verhindert wurde, wurde eine hohe Schädigungsrate bei Anwesenheit von Licht und Sauerstoff nachgewiesen (Lit. siehe Krinsky, 1968). Auch bei nicht photosynthetisch aktiven Lebewesen scheinen die Carotinoide möglicherweise einen Schutz gegen die phototoxischen Wirkungen des Lichtes zu bieten. Webb et al. (1977) fanden, daß Carotinoide bei *Sarcina lutea* im Wellenlangenbereich von 300-370nm optimal schützen, in einem Bereich, in dem die extrahierten Carotinoide keine Absorption aufweisen. Anwar et al. (1977) postulierten einen Schutz von Naphtochinon durch lipid-assoziierte Carotinoide bei *Sarcina lutea*. Ebenso wird eine schützende Wirkung der Carotinoide bei *Mycobakterium* sp. und *Myxococcus xanthus* (Lit. siehe Krinsky,

1968) beschrieben.

In einer Reihe von Untersuchungen konnten Hinweise dafür gefunden werden, daß Carotinoide auch bei Tieren einen gewissen Schutz vor Strahlungsschaden gewährleisten können. Epstein (1977), Mathews-Roth (1982, 1983) und Mathews-Roth und Krinsky (1984) konnten zeigen, daß Langzeit-Fütterung mit β -Carotin, Canthaxanthin und Phytoen die durch Bestrahlung mit UV-B hoher Dosis induzierte Tumorbildung bei haarlosen Mäusen (Hsu et al., 1975) verhindern oder verzögern kann. Santamaria et al. (1985) schlossen aus ihren Ergebnissen auf einen Schutz durch β -Carotin und Canthaxanthin bei Albinomäusen vor Benzpyren- und 8-Methoxypsoralen-Carcinogenese nach Bestrahlung mit Wellenlängen zwischen 300 und 400nm. Weiter wurde festgestellt, daß β -Carotin bei Menschen mit Erythropoietischer Porphyrie eine Verbesserung der Symptome bewirken kann (Mathews-Roth, 1985).

Bisher gibt es nur wenige Untersuchungen, die sich mit der Funktion der Carotinoide bei Pilzen beschäftigen. Goldstrohm und Lilly (1955) fanden, daß der Pilz *Dacryopinax spathularia*, wenn er im Dunkeln angezogen und dann dem Licht ausgesetzt wird, im Gegensatz zur im Licht angezogenen und Carotinoide enthaltenden Kontrolle rasch abgetötet wird. Dagegen konnte in Gegenwart eines Sensibilisators kein Schutz festgestellt werden. Morris (1974) fand, daß Albinostämme von *Neurospora crassa* und auch der durch Anzucht in Gegenwart von β -Ionon carotinoidfreie Wildstamm sensitiver gegenüber UV-Strahlung reagierten als der pigmentierte Wildstamm. Blanc et al. (1976) und Thomas et al. (1981) folgerten aus ihren Daten einen geringfügigen Schutz durch Carotinoide in Conidien von *Neurospora crassa*. Will III. et al. (1987) konnten eine höhere Resistenz gegenüber "photokilling" bei carotinoidakkumulierenden Mutanten des Pilzes *Ustilago violacea* im Vergleich zum Wildstamm feststellen. Schrott (1985) fand, daß Myzel von *Fusarium aquaeductuum* umso resistenter gegenüber UV-A-Strahlung ist, je höher der Gehalt an lichtinduzierten Carotinoiden ist. Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß nur eine zufällige Korrelation zwischen Pigmentgehalt

und UV-Schädigung besteht; ein Regenerationsvermögen, welches analog zu den Carotinoiden durch Blaulicht induziert würde, wurde diskutiert.

Um die Frage nach der Schutzfunktion der Carotinoide bei *Fusarium aquaeductuum* zu klären, versuchte Huber-Willner (1982) zum einen die Akkumulation gefärbter Carotinoide nach Induktion mit Blaulicht durch Applikation von Diphenylamin zu hemmen, zum anderen exogenes β -Carotin durch Ultraschallbehandlung in das Pilzmyzel einzuschleußen und im Anschluß die UV-Empfindlichkeit zu untersuchen; beide Versuchsansätze lieferten jedoch keine schlüssigen Ergebnisse.

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, am Beispiel des imperfekten Wasserpilzes *Fusarium aquaeductuum* zu klären, ob und in welchem Umfang die Carotinoide eine Schutzfunktion gegen UV-B-Strahlung ausüben; falls dies der Fall ist, dann könnte die Photoregulation der Carotinoidbiosynthese als aktive Anpassung an das Strahlungsklima der Umwelt erklärt werden. Um eine Schutzfunktion zweifelsfrei nachzuweisen und ihren Umfang zu klären, muß aber folgender Gesichtspunkt berücksichtigt werden: Durch Belichtung des Organismus' könnte neben der Induktion der Carotinoidsynthese noch ein weiterer "Mechanismus" induziert werden, der dann z.B. im Sinne einer "photoprotection" oder eines "repair"-Systems wirkt. Einige Angaben in der Literatur lassen dies durchaus möglich erscheinen. Eine gut untersuchte Art der "photoprotection" wird von Jagger (1972) bei *E. coli* beschrieben, bei der eine Vorbelichtung mit UV-A eine Hemmung des Wachstums bewirkt ("growth delay"), die letzten Endes dazu führt, daß extensive Reparaturen geschädigter DNA durchgeführt werden. Swenson et al. (1975) beobachteten, daß mit UV-A bestrahlte Zellen von *E. coli* B/r eine geringere Hemmung der Atmung durch schädigende Strahlung aufweisen. Bei dem Bakterium *Ectothiorhodospira shaposhnikovii* konnten Masinovsky und Rubin (1976) eine "photoprotection" nachweisen, bei der vermutlich die Synthese eines Tocopherol-ähnlichen Lipides eine Rolle spielt. Ein induzierbares Reparatursystem wird von Peters und Jagger (1981) bei *E. coli* beschrieben, das nur in der exponentiellen

Wachstumsphase wirksam ist. Chatterjee und Bhattacharjee (1976) fanden ein durch UV-B und UV-A induziertes Reparatursystem bei *Amoeba proteus*. *Anacystis nidulans* synthetisiert nach Bestrahlung mit Weißlicht ein Protein, welches durch UV-Strahlung hervorgerufene Schaden reparieren kann (Bhattacharjee, 1977). In diesem Zusammenhang muß auch das induzierbare SOS-System (Howard-Flanders, 1981) erwähnt werden, auf das schon eingegangen wurde.

Zur Beantwortung der Frage nach der Schutzfunktion der Carotinoide erschienen vergleichende Untersuchungen von Wildstamm und einigen Mutanten von *Fusarium* erfolgversprechend. Dabei handelt es sich einerseits um Mutanten, die auch ohne Belichtung Carotinoide synthetisieren (sog. rd-Mutanten), aber dieselben Pigmente wie der Wildstamm bilden (Lang, 1969) und andererseits um Mutanten, die nach Belichtung ein abweichendes Carotinoidmuster synthetisieren (Biosynthese-Mutanten), wie schon aus dem Phänotyp einer gelben (Mutante car "m1202") und einer weißen Mutante (Mutante car "m1009") ersichtlich ist. Grundvoraussetzung für diese Untersuchungen war eine Analyse der lichtinduzierten Carotinoidbiosynthese bei den Mutanten. Zunächst sollte der Verlauf der Carotinoidsynthese nach Lichtinduktion (Akkumulationskinetik) geklärt und die Dosis-Effekt-Kurve nach verschieden langer Induktion für die verschiedenen Stämme erstellt werden. Ferner mußte die Zusammensetzung der von den Biosynthesemutanten gebildeten Carotinoidgemische ermittelt und mit dem Wildstamm verglichen werden. Schließlich sollten dann an Wildstamm und Mutanten Schädigungen aufgezeigt werden, die durch UV-B-Strahlung hervorgerufen werden. Dafür wurden Intensitäten gewählt, die durchaus im Rahmen der Intensitäten liegen, die unter den derzeit herrschenden Ozonbedingungen in der Stratosphäre auf die Erdoberfläche auftreffen.

Für diese Untersuchungen mußte ein weiterer Faktor berücksichtigt werden: Da die Carotinoidsynthese nur unter "step-down"-Bedingungen, d.h. unter Bedingungen bei denen ein Myzelwachstum unterbleibt, optimal verläuft wurde das Myzel für die Untersuchungen in ein Minimalmedium eingebracht. Gleichzeitig

wurden dadurch wachstumsbedingte Schwankungen der UV-Sensitivität (Huber-Willer, 1982) während des Versuchs ausgeschlossen. Jagger (1972) konnte zeigen, daß Zellen von *E. coli* mit verzögertem Wachstum ("growth delay") weniger durch Strahlung geschädigt werden. Tang und Patrick (1977) beschreiben eine "liquid holding recovery" bei *E. coli* nach schädigender Bestrahlung. Uvr-Mutanten von *E. coli* können sich von Schädigung durch Strahlung erholen, wenn sie im Anschluß an die Bestrahlung in Minimalmedium gehalten werden ("minimal medium recovery") (Jagger, 1985). Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es deshalb, den Einfluß einer Inkubation in Minimalmedium auf die Reaktion gegenüber schädigender Strahlung zu untersuchen. Ferner sollte geklärt werden, inwieweit eine Regeneration von den durch die UV-B-Einstrahlung ausgelösten Schaden unter den gegebenen "step-down"-Bedingungen möglich ist.

Wie bereits oben ausgeführt wurde, ist ein wichtiger Aspekt bei der Diskussion lichtinduzierter Schädigungen die Frage nach dem Angriffspunkt ("target") der Strahlung. In diesem Zusammenhang sind neben der DNA, die vor allem durch kurzwellige UV-Strahlung geschädigt wird, die Membranen von großer Bedeutung (Koch et al., 1976; Moss und Smith, 1981; Schrott, 1985). Die Sensitivität der Organismen gegenüber UV-Strahlung sollte daher von der Lipidzusammensetzung der Membranen beeinflusst werden, zumal Phospholipide und Sterine selbst sehr stark kurzwellige Strahlung absorbieren. Aus diesem Grunde wurden der Wildstamm und die verschiedenen Mutanten auf der Ebene der Lipide untersucht und die Lipidmuster miteinander verglichen.

Die Untersuchungen über die durch UV-B-Strahlung verursachten Schädigungen und die Rolle der Carotinoide als Schutzpigmente sollen auch einen Beitrag leisten zur Abschätzung des Risikos, welches mit einem sich verstärkenden Abbau der stratosphärischen Ozonschicht und der daraus resultierenden größeren Strahlenbelastung für die Organismen auf der Erde verbunden ist.

II. Material und allgemeine Methoden

1. Pilzmaterial und Anzucht

Versuchsobjekt eines Teils der durchgeführten Versuche war der imperfekte Wasserpilz *Fusarium aquaeductuum*, der bereits in früheren Untersuchungen (Rau und Zehender, 1959; Lit. siehe Rau, 1967b) verwendet wurde. Alle anderen Versuche wurden mit Mutanten des Wildstammes durchgeführt. Dabei handelte es sich zum einen um Mutanten mit einer vom Wildstamm abweichenden Carotinoidzusammensetzung (die sog. gelbe Mutante car "m1202" und die sog. weiße Mutante car "m1009"), die nach Behandlung mit Nitrosoguanidin gefunden wurden (Rau und Rau-Hund, unveröffentlicht), zum anderen um eine Mutante mit einer vom Wildstamm abweichenden Regulation der Carotinoidbiosynthese, der sog. Mutante rd-1, die 1968 von Theimer nach UV-Bestrahlung von Conidien isoliert wurde.

Die Anzucht des Pilzes erfolgte im Dunkeln oder bei schwachem Rotlicht (Leuchtstoffröhren Philips TL 40W, Lichtfarbe 15; Filter Röhm & Haas, Darmstadt, Nr.501), das keine Carotinoidsynthese induziert (Rau, 1967a).

Zur Standardisierung der Anzuchtbedingungen wurde ein 1l-Erlenmeyerkolben, der 300ml einer 3%-igen Biomazllösung enthielt, mit 25ml Pilzsuspension aus einer Stammkultur inokuliert und 30h lang bei $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

Die notwendige Sauerstoffversorgung wurde durch ständiges Schütteln auf einer Schüttelmaschine mit einer Frequenz von 74/min und einer Amplitude von 4,25cm gewährleistet. Aus dieser Kultur wurden je 25ml Pilzsuspension entnommen und die erforderliche Zahl an Erlenmeyerkolben zur Anzucht beimpft. Da die Sensitivität des Pilzmyzels gegenüber UV-Strahlung vom physiologischen Alter abhängig ist (Huber-Willer, 1982), die Wachstumsrate des Myzels jedoch jahreszeitlichen Schwankungen unterlag, wurde die Anzuchtdauer zw. 17h und 19h variiert. So war es möglich, für die Versuche Myzel desselben physiologischen Alters bereitzustellen. Das Trockengewicht pro Anzucht-

kolben betrug $400\text{mg} \pm 50\text{mg}$; dies entspricht nach den Ergebnissen von Huber-Willer (1982) dem Trockengewicht eines 18h alten Myzels.

2. Versuchsdurchführung

2.1. Myzelernte, Überführung in Minimalmedium und Akkommodation

Die Anzucht wurde beendet, indem das Pilzmyzel mittels eines Buchnertrichters (Filterpapier Ederol Nr. 30 N) von der Nährlosung abgenutscht, mit 500ml dest. Wasser pro Anzuchtkolben gewaschen und in dest. Wasser resuspendiert wurde. Die für die Versuche optimale Dichte der Pilzsuspension wurde nach nephelometrischer Dichtebestimmung eingestellt. Hierzu wurden 3 Parallelproben einer 1:10 Verdünnung der Pilzsuspension angesetzt und die Extinktion bei 400nm gemessen. Die Suspension wurde mit Wasser so verdünnt, daß sich eine Extinktion von 420mA ergab.

Zur Bestimmung des Trockengewichtes wurden der Pilzsuspension dreimal 10ml entnommen, in Wägegläschen gefüllt und 24h bei 120°C getrocknet. Anschließend wurden die Gläschen im Exsiccator abgekühlt, äquilibriert und sodann gewogen.

Von der homogenen Pilzsuspension wurden je 100ml in Gaswaschflaschen (250ml) pipettiert, die bereits 100ml eines $1/30$ molaren KH_2PO_4 -Puffers mit 4% Glucose enthielten. Diese Suspension wird im folgenden als Versuchssuspension bezeichnet. Durch die Überführung in das Minimalmedium wurden Bedingungen geschaffen unter denen Myzelwachstum unterbleibt und die Voraussetzungen für die Carotinoidbiosynthese optimiert sind (Rau, 1967a).

Abhängig vom jeweiligen Versuchstyp erfolgte eine Akkommodation des Pilzes (Schrott, 1980) an das neue Milieu, die entweder 2h oder 24h dauerte. Durchstrom von Luft (ca. 4l/h) sorgte für ausreichend aerobe Bedingungen.

Die nicht zu belichtenden Proben blieben über die gesamte Ver-

suchsdauer hinweg an den Luftstrom angeschlossen.

2.2. Belichtung

2.2.1. Verwendete Lichtquellen und Filter

2.2.1.1. Blaulicht

Für die Blaubelichtung wurden 2 Aggregate mit je 3 Blaulichtleuchtstoffrohren (Interneon, Röhm Filter 625, Emissionsspektrum siehe Abb.2) in einem Abstand von 20cm verwendet. Für die sich zwischen beiden Aggregaten befindenden Proben ergab sich eine Lichtintensität von 28W/m^2 .

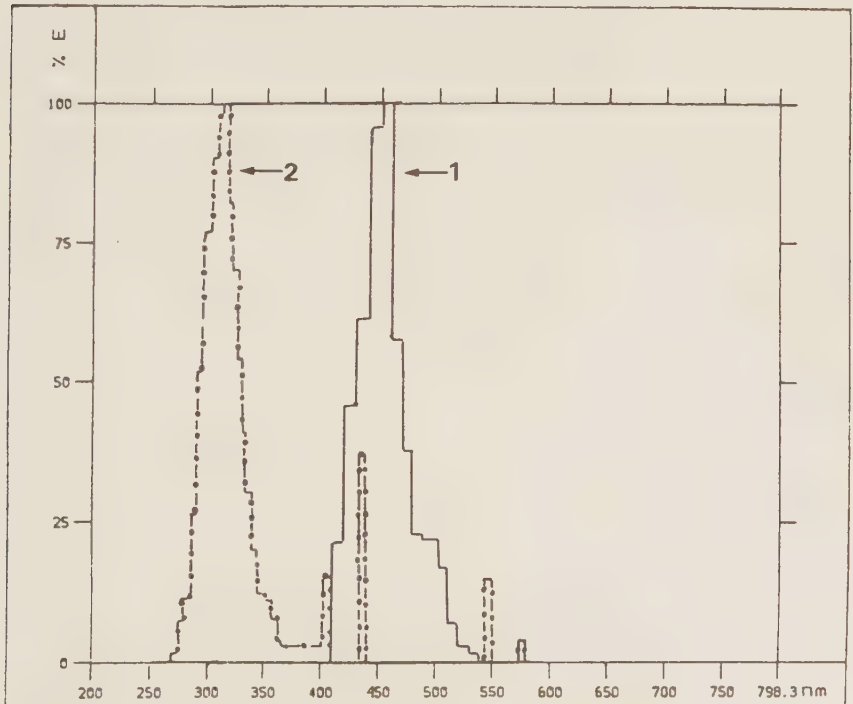


Abb. 2:
Spektrale Emission (E) der verwendeten Lichtquellen
Interneon (Blaulicht) (1); Philips TL 40 W / 12 (UV-B) (2).

2.2.1.2. UV-B

Für die UV-B-Bestrahlung wurden zwei Aggregate mit jeweils zwei Leuchtstoffröhren (Philips, TL 40W/ 12) verwendet. Wie aus dem Emissionsspektrum der UV-B-Röhren (Abb.2) ersichtlich ist, wird neben dem erwünschten Anteil an UV-B-Strahlung auch Licht benachbarter Wellenlängenbereiche emittiert. Um diese spektralen Anteile zu absorbieren, wurde zwischen beide Aggregate eine Kuvette (Plexiglas PG 625, Röhm & Haas, Darmstadt;) gestellt, in der sich eine als Filter wirkende Lösung befand, die im folgenden als Flüssigfilter bezeichnet wird. Der Flüssigfilter enthielt folgende Komponenten:

Pikrinsäure (0,04 mM), Chrysoidin (0,022 mM), Uridin (0,072 mM) und als Stabilisator Acetatpuffer (10 mM, pH 5,0). Die Extinktion dieser Lösung bei der Wellenlänge $\lambda = 290\text{nm}$ betrug 180mA ($\pm 5\text{mA}$), was einer Transmission von 66% und einer Bestrahlungsintensität im gesamten UV-B-Bereich von 400mW/m^2 für die sich in der Kuvette befindenden Proben entsprach.

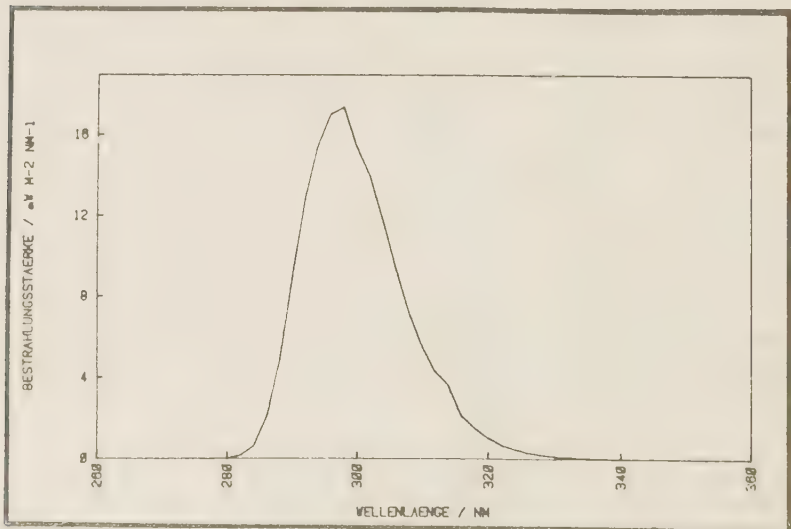


Abb. 3:

Spektrale Energieverteilung der auf die Proben einwirkenden UV-B-Strahlung einer Gesamtbestrahlungsstärke von 400mW/m^2 .

Da sich die spektralen Eigenschaften des Flüssigfilters unter dem Einfluß von UV-B-Strahlung veränderten, wurde in Abständen von 60min das Absorptionsspektrum des Flüssigfilters kontrolliert und die Extinktion bei 290nm gemessen. Wenn nötig wurde die Lösung mit dest. Wasser so verdünnt, daß sich erneut eine Extinktion von 180mA ergab.

Bei einigen Versuchen wurde nur eine Intensität von 60mW/m^2 verwendet, die dadurch erzielt wurde, daß die zu belichtenden Gefäße mit einem Metallnetz definierter Durchlässigkeit umgeben wurden.

2.2.2. Die Belichtung mit Blaulicht

Die zu belichtenden Gaswaschflaschen wurden zwischen die beiden im Abschnitt 2.2.1.1. beschriebenen Aggregate gestellt. Bei Belichtungszeiten länger als 30min wurden die Proben in einer mit Wasser gefüllten Küvette (Plexiglas Nr.218) inkubiert. Ein Thermostat sorgte für eine konstante Temperatur von 20°C . Durchstrom von Sauerstoff schuf optimale Bedingungen für die sauerstoffabhängige Induktion der carotinoidsynthetisierenden Enzyme (Rau, 1971) und verhinderte einseitige Beschattung der Hyphen.

Nach der entsprechenden Belichtungsdauer wurden die Proben über eine bestimmte Zeit hinweg im Dunkeln weiter inkubiert und dann entweder der Carotinoidbestimmung zugeführt (Kap. II. 3.) oder mit UV-B bestrahlt.

2.2.3. Die Bestrahlung mit UV-B

Für die UV-B-Bestrahlung mußten anstelle der Gaswaschflaschen Quarzgefäße verwendet werden, die für Licht einer Wellenlänge größer als 260nm eine 100%-ige Transmission aufweisen. Ansonsten wurden dieselben Bedingungen gewählt wie unter 2.2.2. beschrieben. Nach Beendigung der Bestrahlung wurde die Carotinoidbestimmung entweder sofort durchgeführt oder erst nach einer bestimmten Inkubationsphase im Dunkeln. Nach Abschluß des gesamten jeweiligen Belichtungsprogramms

wurde allen Proben gleichzeitig Chloramphenicol (Endkonz. 0,1mg/ml) zur Verhinderung von Bakterienwachstum zugegeben.

2.3. Bestimmung der Atmung nach Warburg

Die Messung des Sauerstoffverbrauchs als ein Kriterium für die Sensitivität des Pilzes gegenüber UV-B, erfolgte nach Warburg. Nach dem jeweiligen Ende der UV-Bestrahlung, sowie 24h danach wurden den Waschflaschen Aliquots von 5ml entnommen, in Warburggefäße pipettiert und über einen Zeitraum von 30min hinweg gemessen.

Der O_2 -Verbrauch wurde nach der üblichen Formel berechnet.

3. Analyse der Carotinoide

3.1. Extraktion der Carotinoide

Carotinoide sind äußerst labile Pigmente, die einer raschen Destruktion unterliegen, wenn sie den Risikofaktoren Licht, Sauerstoff und Wärme ausgesetzt werden. Während der gesamten Extraktion mußte also darauf geachtet werden, daß die Carotinoidlösungen möglichst abgedunkelt und mit Stickstoff überschichtet waren. Kühlen der verwendeten Chemikalien und Aufbewahren der Carotinoidlösungen im Gefrierfach des Kühlschranks waren notwendig, um thermische Zerstörung der Pigmente zu verhindern. Bei allen Arbeitsschritten wurden p.A.-Chemikalien verwendet, um Verunreinigungen vorzubeugen, die zu Veränderungen des Absorptionsspektrums der Carotinoide führen könnten.

Am Ende der jeweiligen Inkubation wurde das Myzel jeder Probe abgenutscht. Dabei wurde entweder eine Porzellannutsche und Filterpapier (Schleicher & Schüll Nr.595) verwendet oder, bei allen Proben in denen Phytoen und Phytoflen untersucht wurde, eine G4-Glasfritte benutzt, um im UV-Bereich absorbierende, aus dem Filterpapier "herausgelöste" Stoffe zu vermeiden. Das Myzel wurde mit dest. Wasser gewaschen und mit ca. 20ml Methanol p.A. quantitativ in 100ml-Plastikschüttelbecher

gespult, in denen schon 2 Lagen Glasperlen ($\varnothing$ 4.8mm) vorlagen. Dies führte zugleich zum Abtöten des Pilzes. Die Proben wurden 30min in den Plastikbechern geschüttelt (Frequenz 144/min, Amplitude 4.5cm). Dadurch wurde das Myzel zerschlagen; Methanol als lipid- und proteinlösende Substanz forderte den Aufschluß des Myzels. Durch Zugabe von 20ml Aceton p.A. und erneutes 30-minütiges Schütteln wurden die Carotinoide nahezu quantitativ aus dem Myzel extrahiert. Die so gewonnene Suspension wurde über eine G3-Glasfritte abgesaugt und mit Aceton gewaschen. Das Filtrat wurde mit ca. 20ml Petrolether (Kp.: 40-60°C) in 1l-Scheidetrichter überführt. Um die in dem Methanol/Aceton- Gemisch vorliegenden Carotinoide in Petrolether überzuführen, wurde 5%-ige Ammonsulfatlösung zugegossen. Nach zweimaligem Waschen der Petroletherphase wurde diese an einem Buchi-Rotavapor "R" bei 30°C eingedampft und sofort in einer definierten Menge eiskalten Petrolethers (Kp.: 60-80°C) aufgenommen, zentrifugiert und photometrisch gemessen.

3.2. Bestimmung der Gesamtmenge an gefärbten Carotinoiden

Zur Bestimmung der Menge an gefärbten Carotinoiden wurde das Absorptionsspektrum im Bereich von 381-559,2nm gemessen (Spektralphotometer Kontron "Uvikon 820") und im Computer (Kontron PSI 80) gespeichert. Als Maß für die Carotinoidmenge wurden relative Einheiten verwendet. Sie sind ein Ausdruck für den prozentualen Anteil der Fläche, welche unter dem gemessenen Absorptionsspektrum liegt, an einer Referenzfläche. Die Referenzfläche entspricht der Fläche, die unter einem Spektrum liegt, welches bei jeder Wellenlänge eine Extinktion von 10 Extinktionseinheiten aufweist. Um die Ergebnisse verschiedener Versuche vergleichen zu können, wurden die relativen Einheiten auf das jeweilige Trockengewicht bezogen und auf ein einheitliches Lösungsmittelvolumen von $y = 10\text{ml}$ (vgl. Kapitel II. 3.5.4.) umgerechnet.

Eine relative Einheit entspricht einer Menge von ca. $7,5\mu\text{g}$ Carotinoiden bei Verwendung eines durchschnittlichen Extinktionskoeffizienten von 2500.

3.3. Auftrennung in neutrale und saure Carotinoide

Sowohl für die chromatographische Auftrennung der Carotinoide (Kap. II. 3.4.), als auch für die Durchführung der computergesteuerten Multikomponentenanalyse (MKA) (Kap. II. 3.5.1.), war es unumgänglich Neurosporaxanthin quantitativ von den anderen Carotinoiden abzutrennen. Bei der chromatographischen Auftrennung wurde nämlich Neurosporaxanthin eine gute Trennung der einzelnen Carotinoide unmöglich machen; bei der MKA würde Neurosporaxanthin mit seinem wenig charakteristischen Absorptionsspektrum zu untolerierbaren Analysefehlern führen. Um eine Abtrennung von Neurosporaxanthin zu erreichen, macht man sich das unterschiedliche Lösungsverhalten der Carotinoidsaure Neurosporaxanthin und der neutralen Carotinoide zunutze. In einem Scheidetrichter wurde die Carotinoidlösung (ca. 20-30ml) mit etwa der gleichen Menge an 90%-igem Methanol p.A. und einigen Tropfen 1N KOH versetzt. Es bildet sich eine Epiphasse (Petrolether) aus, in der sich die neutralen Carotinoide befinden und eine methanolische Hypophase, in der Neurosporaxanthin vorliegt. Um eine möglichst vollständige Trennung zu erzielen, mußten beide Phasen noch zweimal mit den jeweils alternierenden Lösungsmitteln ausgeschüttelt werden. Zur Bestimmung von Neurosporaxanthin wurde die Hypophase jeder Probe mit ca. 20ml Toluol p.A. versetzt. Durch Zugabe von 5%-iger Ammonsulfatlösung und einigen Tropfen Eisessig wurde Neurosporaxanthin in die Toluol-Phase übergetrieben. Sowohl die Epiphasse, als auch die Hypophase wurden zweimal mit dest. Wasser gewaschen. Die Hypophasen wurden eingedampft, in einem best. Volumen Petrolether (Kp.: 60-80°C) aufgenommen und standen nun für die Messung (Kap. II. 3.5.2.) bereit. Die Epiphasse wurde mit einem Überschuß an wasserfreiem Na_2SO_4 versetzt, um restliches Wasser zu entfernen. Spuren von Neurosporaxanthin wurden durch eine Spatelspitze $\text{Ca}(\text{OH})_2$ aus der Lösung entfernt. Anschließend wurden die Epiphasen eingedampft, in wenig n-Hexan p.A. aufgenommen, erneut eingedampft, um Spuren von Petrolether zu entfernen und in einer definierten Menge an

n-Hexan p.A. aufgenommen. Dabei mußte darauf geachtet werden, daß die Carotinoidlösung möglichst konzentriert für die chromatographische Auftrennung (Kap. II. 3.4.) und für die MKA (Kap. II. 3.5.1.) vorlag. Auf der anderen Seite brachte eine Konzentrierung der Lösung auch eine Konzentrierung der in der Lösung vorhandenen Sterine und Phospholipide mit sich, wobei die Gefahr bestand, daß sie als Lösungsmittel für die Carotinoide zu Veränderungen des Absorptionsspektrums der Carotinoide führten, und folglich die Analysengenauigkeit der MKA negativ beeinflussten.

Große Mengen an Sterinen führen außerdem zu einem Verschmieren der einzelnen Carotinoidbanden bei chromatographischen Auftrennungen (Kap. 3.4.).

Es erwies sich als vorteilhaft, die Sterine aus entsprechenden Proben auszufrieren. Die Pigmentlösungen wurden hierzu über Nacht bei -70°C gehalten und dann 10min bei 3000rpm in einer Kuhlzentrifuge (MSE-High-Speed-18) bei -25°C zentrifugiert. Die klaren Überstände standen nun für die durchzuführenden Analysen bereit.

3.4. Chromatographie von Carotinoidlösungen

3.4.1. Säulenchromatographie zur Auftrennung gefärbter Carotinoide

Für die qualitative Analyse wurden die epiphasischen Pigmentgemische zuerst säulenchromatographisch aufgetrennt. Die konzentrierten Lösungen wurden auf Säulen aufgetragen, die mit einer Mischung aus Calciumhydroxid (Merck) (3,5 Teile) und Hyflo-Super-Cel (Roth) (1,5 Teile) gefüllt waren. Säulendurchmesser und -höhe richteten sich nach den absoluten Mengen an aufzutragenden Carotinoiden, wobei der Säulendurchmesser zw. 0,5cm und 2,5cm variierte und die Säulenhöhe zw. 5,0cm und 15cm. Die Auftrennung erfolgte durch Elution mit einem Gemisch aus Petrolether p.A. (Kp.: $60-80^{\circ}\text{C}$) und Toluol bei schwachem Sog einer Wasserstrahlpumpe. Die Konzentration an Toluol wurde stufenweise erhöht von 0%, über 30%, 50% auf 100%. Während der

gesamten Laufzeit wurde die Säule gekühlt und Tageslicht so weit wie möglich ausgeschlossen.

Die Lösungsmittelfront mit den relativ unpolaren Carotinoiden (Pytoen, Phytofluen, ζ -Carotin, Neurosporin, β -Zeaxcarotin und β -Carotin) wurde aufgefangen. Dieses Elutionsgemisch wurde durch Dünnschichtchromatographie weiter aufgetrennt (Kap. II. 3.4.2.).

Die verbleibenden, auf der Säule trennbaren Komponenten der Biosynthesemutanten waren in so geringen Mengen vorhanden, daß es im Gegensatz zum Wildstamm (Bindl, 1968) und der Mutante rd-1 (Lang, 1969) nicht möglich war, sie an Hand ihres Absorptionsspektrums zu identifizieren. Deshalb wurde ihr Laufverhalten auf der Säule mit dem Laufverhalten von Pigmenten, die aus dem Wildstamm isoliert wurden, verglichen und auf diese Weise den Wildstammpigmenten zugeordnet.

3.4.2. Dünnschichtchromatographie zur Auftrennung gefärbter Carotinoide

Zur Auftrennung der mit der Lösungsmittelfront aus der Ca(OH)_2 -Säule eluierten Pigmente (Kap. 3.4.1.), wurde das eingeeengte Elutionsgemisch auf Kieselgel-60-Fertigplatten (Schichtdicke 0,25mm, Merck), welche vorher 30min bei 120°C aktiviert wurden, aufgetragen. Die Entwicklung erfolgte in einem Laufmittelgemisch aus Petrolether (Kp.: 60-80°C) und Toluol p.A. (92 Teile + 8 Teile) bei 4°C und in Dunkelheit. Anschließend wurden die einzelnen Banden in N_2 -Atmosphäre von der Platte abgeschabt und in Erlenmeyerkolbchen eingebracht, in denen schon 20ml eines Gemisches aus Methanol/Aceton (10ml + 10ml) vorlagen. Die Suspensionen wurden über eine G4-Glasfritte abgenutscht, die klaren Pigmentlösungen am Rotationsverdampfer zur Trockene eingedampft und in wenig n-Hexan p.A. aufgenommen, nochmals eingedampft, in ca. 2ml n-Hexan p.A. aufgenommen und zentrifugiert. Anschließend wurden die Absorptionsspektren photometrisch ermittelt und im Computer gespeichert (Kontron "Uvikon 820" online mit Kontron PSI 80). Eine Zuordnung zu den Carotinoiden des Wildstammes

erfolgte über einen Vergleich der Absorptionsspektren.

3.4.3. Saulenchromatographische Auftrennung von im UV-Bereich absorbierenden Carotinoiden

Eine Bestimmung der im UV-Bereich absorbierenden Pigmente Phytoen und Phytofluen erfolgte über eine Auftrennung des Pigmentgemisches an einer Aluminiumoxid-Säule. Die Carotinoide wurden aus relativ großen Myzelmenen (ca. 2-4g TGW) extrahiert, um auch noch geringe Pigmentmengen nachweisen zu können. Der sehr konzentrierte Extrakt wurde auf eine Säule (Ø 4,5cm) mit 50g Aluminiumoxid (Al_2O_3 90 aktiv, neutral, Merck, Brockmann-Grad I-II) aufgetragen. Die vergleichsweise große Menge an Aluminiumoxid (vgl. Mitzka-Schnabel, 1978) war nötig, um eine gute Auftrennung trotz des hohen Gehaltes an Sterinen zu erzielen. Die Elution erfolgte durch Aufbringen von jeweils 100ml eines Gemisches aus Petrolether (Kp.: 40-60°C) und Diethylether p.A. mit stufenweise zunehmender Konzentration an Diethylether (0-45%). Mit Hilfe eines Fraktionskollektors wurden Fraktionen zu jeweils 500 Tropfen aufgefangen, am Rotationsverdampfer zur Trockene eingedampft, und in einem definierten Volumen Petrolether p.A. (Kp.: 60-80°C) aufgenommen. Anschließend erfolgte die photometrische Mengenbestimmung von Phytoen und Phytofluen (Kap. II. 3.5.3.). Für die routinemäßige Bestimmung relativ großer Mengen an Phytoen bei Mutante car "m1009" (Kap. IV. 1.1.2. und 1.2.2.) wurden kleine Säulen mit 5g Aluminiumoxid (Brockmann-Grad I-II) gewählt, auf denen die Carotinoidlösungen chromatographiert wurden. Die Elution erfolgte durch 50ml eines Laufmittels aus Petrolether und Diethylether (99 Teile + 1 Teil). Das Eluat wurde wiederum zur Trockene eingedampft und in definiertem Volumen an Petrolether p.A. (Kp.: 60-80°C) aufgenommen. Die Bestimmung an Phytoen erfolgte wie in Kap. II. 3.5.3. beschrieben.

3.5. Mengenbestimmung der einzelnen Carotinoide

3.5.1. Computergestützte Multikomponentenanalyse (MKA) des epiphasischen Carotinoidgemisches

Die Mengenbestimmung der gefärbten Komponenten der Epiphase erfolgte über die computergestützte Multikomponentenanalyse (MKA) (Schrott und Jochum, 1984). Hierzu wurden die Spektren der epiphasischen Carotinoidlösungen gemessen und gespeichert (Kontron "Uvikon 820" online mit Kontron PSI 80). Die Analyse erfolgte unter Verwendung isolierter und gereinigter Referenzcarotinoide (Roth, 1983). Bei der Analyse von Gemischen des Wildstammes und der Mutante rd-1 wurden ausschließlich Referenzcarotinoide verwendet, die aus dem Wildstamm gewonnen wurden (Reger, 1982; Roth, 1983), während für die MKA von Pigmentgemischen der gelben Mutante car "m1202" ζ -Carotin, Neurosporin und β -Zeaxanthin (Abb.9,10,11) neu als Referenzsubstanzen isoliert werden mußten. Alle übrigen Carotinoide entsprachen denen des Wildstammes. Die Zuverlässigkeit der ermittelten Analysenergebnisse wurde über die Parameter "Approximationsfehler", "Abhängigkeit des Standards" und "erwarteter Gesamtfehler" beurteilt.

3.5.2. Bestimmung von Neurosporaxanthin

Die Bestimmung der Menge an Neurosporaxanthin erfolgte durch Ermittlung der Extinktion im Absorptionsmaximum, das im Wellenlängenbereich von 470-480nm (meist bei 477nm) zu finden war.

3.5.3. Bestimmung von Phytoen und Phytofluoren

Für die Bestimmung von Phytoen und Phytofluoren wurden die Absorptionsspektren gemessen. Im Falle des Phytoens wurde die Messung im Bereich von 240-340nm vorgenommen, wobei das Maximum der Absorption bei $\lambda = 282\text{nm}$ lag; im Falle des Phytofluens erfolgte die Messung im Wellenlängenbereich von 300-400nm

(Absorptionsmaximum bei $\lambda = 346\text{nm}$).

3.5.4. Berechnung der Menge an Carotinoiden

Aus den gemessenen bzw. über die MKA ermittelten Extinktionswerten im Absorptionsmaximum konnten die Carotinoidmengen kalkuliert werden.

Folgende Formel lag den Berechnungen zu Grunde:

$$\text{Carotinoide (g)} = \frac{E \times y}{E_{1\%}^{1\text{cm}} \times 100}$$

E = Extinktion im Absorptionsmaximum

$E_{1\%}^{1\text{cm}}$ = Extinktionskoeffizient (Roth, 1984)

y = Lösungsmittelvolumen (ml)

Um die Ergebnisse einzelner Versuche vergleichen zu können, wurden die Mengen an synthetisierten Carotinoiden auf das jeweilige Trockengewicht bezogen.

III. Spezielle Methodik

1. Bestimmung von Aufnahme und Einbau von radioaktiv markiertem ^{35}S -L-Methionin

1.1. Versuchsdurchführung

Die Anzucht des Myzels erfolgte wie im Abschnitt II. 2.1. beschrieben. Eine Stunde vor Ernte des Myzels wurden pro Anzuchtkolben 480mg nicht radioaktives L-Methionin zugegeben. Dies sollte eine evtl. während des Myzelwachstums auftretende Verarmung des Nährmediums an Methionin kompensieren und so ein überschießen der Methionin-Aufnahme durch den Pilz während des eigentlichen Versuches verhindern (Huber-Willer, 1982). Myzel-ernte und Überführen in das Puffer-Glucose-Minimalmedium erfolgten wie ebenfalls unter II. 2.1. beschrieben. Eine Stunde vor Ende der jeweiligen Akkommodationsphase, die entweder 2h oder 24h dauerte, wurde nochmals aus den schon oben erwähnten Gründen kaltes L-Methionin zugegeben (Endkonz. im Minimalmedium 0,1mg/ml).

Zu Versuchsbeginn, d.h. nach Ende der jeweiligen Akkommodationszeit, wurden 4 μCi L- ^{35}S -Methionin (Amersham) pro 100ml Versuchssuspension in die Gaswaschflaschen, in denen die Dunkelkontrollen inkubiert wurden, bzw. in die Quarzgefäße, in denen das Myzel belichtet wurde, zupipettiert. Zur Bestimmung der aufgenommenen Radioaktivität wurden aus allen Proben sofort und zu versch. Zeiten danach jeweils 5ml Pilzsuspension entnommen.

1.2. Bestimmung des ins Myzel aufgenommenen ^{35}S -L-Methionins

Die halbe Anzahl der Aliquots wurde in Reagenzgläser, die 5ml eiskaltes dest. Wasser enthielten, pipettiert ("H₂O-Proben") und 20sec kraftig gemischt (Supermixer, Lab-Line Instruments Inc.). Diese Suspension wurde dann sofort über eine Metall-

fritte mit dem Filterpapier "Whatman GFC" (Ø 2,4cm) abgenutscht und dreimal mit 5ml eiskaltem dest. Wasser nachgewaschen, um am Myzel anhaftendes, nicht aufgenommenes radioaktives Methionin möglichst quantitativ zu entfernen. Die abgenutzten Proben wurden anschließend zum Trocknen und Ausbleichen eventuell vorhandener Carotinoide 24h unter eine UV-Lampe gelegt. Zur Bestimmung der ins Myzel aufgenommenen Radioaktivität wurden dann die Myzelplättchen in 5ml Toluol-Butyl-pBD eingelegt (2-(4-t-Butyl-phenyl)-5-(4-biphenyl)-1,2,5-Oxadiazol; 7g/l; Fa. Zinsser) und im Szintillationszähler (Kontron) auf 2% Fehlergenauigkeit bzw. maximal 30min gezählt.

Die Zählergebnisse (cpm) der einzelnen Proben wurden mit Hilfe des externen Standard-Kanalverhältnisses auf ihre Vergleichbarkeit überprüft.

1.3. Bestimmung der Menge an eingebautem ^{35}S -L-Methionin

Die übrigen entnommenen Aliquots wurden in 5ml 20%-iger TCA (w/v) suspendiert ("TCA-Proben"), abgenutscht, zweimal mit 5ml 10%-iger TCA (w/v) und einmal mit 5ml 70%-igem Ethanol (v/v) gewaschen.

Durch die Behandlung mit TCA wurde nur in Protein eingebautes radioaktives Methionin erfaßt, während nicht fixiertes radioaktives Material ausgewaschen wurde (Huber-Willer, 1982). Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte analog zu der für die " H_2O -Proben" beschriebenen Methode.

1.4. Bestimmung der im Medium vorhandenen Menge an ^{35}S -L-Methionin

Sowohl zu Beginn als auch am Ende des Versuches wurde die Menge des im Medium vorhandenen ^{35}S -L-Methionins bestimmt. Hierzu wurden der Versuchssuspension 5ml entnommen und über Whatman-GFC-Filter abgenutscht. 0,5ml des Filtrats wurden in ein Szintillationsgläschen pipettiert, welches 10ml eines Dioxancocktails mit folgender Zusammensetzung enthielt: 1l

Dioxan, 100g Naphtalin, 7g Butyl-pBD. Die Proben wurden im Szintillationszähler auf 2% Fehlergenauigkeit gezählt.

2. Analyse der Lipide

2.1. Analyse des Lipidgemisches aus dem gesamten Myzel

2.1.1. Lipidextraktion

Zur Extraktion der Lipide aus dem Myzel wurde die Versuchssuspension jeder Waschflasche über eine Porzellannutsche abgesaugt (Filterpapier Schleicher & Schüll Nr. 595), mit dest. Wasser gewaschen und das Myzel in 30ml- Zentrifugengläser überführt. Nach Zugabe von Chloroform/Methanol (2 Teile + 1 Teil) (Methode nach Folch, Lit. siehe Rouser et al., 1967) wurden die Proben 10min lang mit Ultraschall behandelt (Sonifierstab Branson B 12, Microspitze, Aussteuerung 70W). Die Trennung von Myzelfragmenten und der Chloroform/Methanol-Phase wurde durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 7000 upm (Beckmann J 21 C, Rotor JA-20) beschleunigt. Das entstandene Sediment wurde noch zweimal mit Chloroform/Methanol extrahiert und die Überstände vereinigt. Diese Extrakte jeder Probe wurden, um restliches Protein zu entfernen, zweimal mit demselben Volumen an dest. Wasser gewaschen, wobei wiederum 10-minütige Zentrifugation für rasche und saubere Trennung beider Phasen sorgte.

Jeder Schritt wurde bei Raumtemperatur durchgeführt, um ein Ausfallen von Sterinen aus der Lösung zu verhindern. Die Aufbewahrung der Lipidextrakte erfolgte bei 4°C, im Dunkeln und unter N₂-Atmosphäre.

2.1.2. Qualitative Bestimmung der Phospholipide

Die Auftrennung der Phospholipide erfolgte eindimensional auf Kieselgelplatten (HPTLC Fertigplatten, Kieselgel 60, 10 x 10cm, Merck), die 30min bei 110°C aktiviert wurden. Als Laufmittel diente ein Gemisch aus Aceton p.A., Toluol p.A. und bidestilliertem Wasser (91 Teile + 30 Teile + 8.5 Teile). Nach der Chromatographie wurden die Platten getrocknet und in eine mit Jod-Dampf gesättigte Kammer eingebracht, um die Phospholipide sichtbar zu machen. Zur Identifizierung der Komponenten wurde ein Lipidextrakt bekannter Zusammensetzung cochromatographiert.

2.1.3. Bestimmung von Sterinen

2.1.3.1. Säulenchromatographie

Die Auftrennung des Lipidgemisches erfolgte über ein Aluminiumoxid-Säule. 5g Aluminiumoxid (Al_2O_3 90 aktiv, neutral, Merck, Brockmann-Grad III) wurden in Petrolether (Kp.: 40-60°C) suspendiert und in eine Glassäule (Ø 0,8cm) gefüllt. Nach dem Auftragen der konzentrierten Lipidlösung wurde mit 80ml eine Gemisches aus 2% Diethylether p.A. in Petrolether (Kp.: 40-60°C) eluiert (Mitzka-Schnabel, 1978). Anschließend wurde die Elution mit 100ml Diethylether p.A. fortgesetzt. In der aufgefangenen 100%-Diethylether-Fraktion befanden sich Prenole und Sterine. Für die Bestimmung der Sterine, deren Hauptkomponente Ergosterin war (Lang, 1969), wurde das Absorptionsspektrum der zur Trockene eingedampften und in einem definiertem Volumen Petrolether (Kp.: 60-80) aufgenommenen 100%-Diethylether-Fraktion im Wellenlängenbereich von 240-340nm gemessen. Als Maß für die Menge an Sterinen diente die Extinktion im Absorptionsmaximum, welches bei 282nm lag, dem Absorptionsmaximum von Ergosterin. Eine Umrechnung dieses Extinktionswertes auf das jeweilige Trockengewicht erlaubte einen Vergleich verschiedener Versuche.

2.1.3.2. Liebermann-Burchard-Test

Zur Identifizierung von Ergosterin diente der von Goad et al. (1967) beschriebene Liebermann-Burchard-Test.

Hierbei wurden zu einem Aliquot des Lipidextraktes 19ml Essigsäureanhydrid und 1ml konzentrierte Schwefelsäure pipettiert, gemischt und nach 5min die Extinktion bei der Wellenlänge = 690nm gemessen. Dieser Wert war ein Maß für die vorliegende Menge an Ergosterin.

2.2. Analyse der Fettsäurezusammensetzung der Membran

2.2.1. Gewinnung der Membranfraktion

Die Versuchssuspension jeweils einer Waschflasche wurde über eine Nutsche mit dem Filterpapier "Schleicher & Schüll Nr. 595" abgesaugt, mit dest. Wasser und anschließend mit Extraktionspuffer (pH 7,8) folgender Zusammensetzung nachgewaschen: 0,2 M Tris-HCl (Serva), 0,2 M Nicotinsäureamid (Serva), 0,002 M DTT (Roth). Das Myzel wurde in einer Reibschale mit 5ml Extraktionspuffer und 2,5g nachgereinigtem Seesand (Merck) 10min lang kräftig zu einem homogenen Brei ("Rohhomogenat") zerrieben. Anschließend wurde das Rohhomogenat bei 2°C zentrifugiert (Beckmann J 21 C, Rotor JA-20). Die Zentrifugation erfolgte in einem Schritt, wobei die Zahl der Rotorumdrehungen pro Minute stufenweise von 2000upm auf zunächst 5000upm und schließlich auf 12700upm erhöht wurde.. Dabei sedimentierten Seesand, intakte Zellen, grobe Zellbruchstücke, subzelluläre Partikel und Mitochondrien (Mitka-Schnabel, 1978). Das Sediment wurde erneut in Extraktionspuffer suspendiert und nochmals wie beschrieben zentrifugiert. Die Überstände (13 KS) beider Zentrifugationen wurden vereinigt und 2h bei 44000 upm zentrifugiert (Kontron Zentrifuge Typ 70, Rotor TFT-70). Die resultierenden Überstände ("120 KS") wurden dekantiert und verworfen. Das Sediment jeder Probe ("120 KP"), das nun vornehmlich Plasmamembranen und Endoplasmatisches Reticulum enthielt, wurde in Extraktionspuffer resuspendiert und stand

für die Lipidextraktion bereit.

2.2.2. Extraktion der Lipide

Das in Extraktionspuffer resuspendierte Sediment ("120 KP") wurde mit Chloroform/Methanol (2 Teile + 1 Teil) versetzt, gründlich vermischt und wie in Kap. III. 2.1.1. zentrifugiert. Die Extraktion wurde zweimal wiederholt und die vereinigten Überstände zweimal mit dest. Wasser gewaschen und zentrifugiert.

2.2.3. Gaschromatographische Auftrennung der Fettsäuren

Die Auftrennung der durch Umesterung aus den Phospholipiden freigesetzten, als Methylester vorliegenden Fettsäuren erfolgte über Gaschromatographie (Varian Gaschromatograph 1860- 4). Dabei wurde folgende Säule verwandt: CP TM SIL 58 (10%) 2m x 1/8", Edelstahl (gepackt) (Morrison und Smith, 1964).

IV. Ergebnisse

1. Einige Charakteristika der Photoregulation und Carotinoidgehalt

Im folgenden Abschnitt wird die lichtabhängige Akkumulation von Carotinoiden, die Abhängigkeit der dabei synthetisierten Carotinoidmenge von der eingestrahlten Lichtdosis und die Pigmentzusammensetzung bei den verschiedenen Mutanten untersucht und mit dem Wildstamm verglichen.

1.1. Akkumulationskinetik der Carotinoide

Beim Wildstamm von *Fusarium aquaeductuum* ist die Carotinoidbiosynthese strikt lichtreguliert. Nach einer lag-Phase von 30 bis 40 Minuten sind die ersten Carotinoide meßbar und nach ca. 14 Stunden ist die Synthese der Carotinoide abgeschlossen (Abb.4).

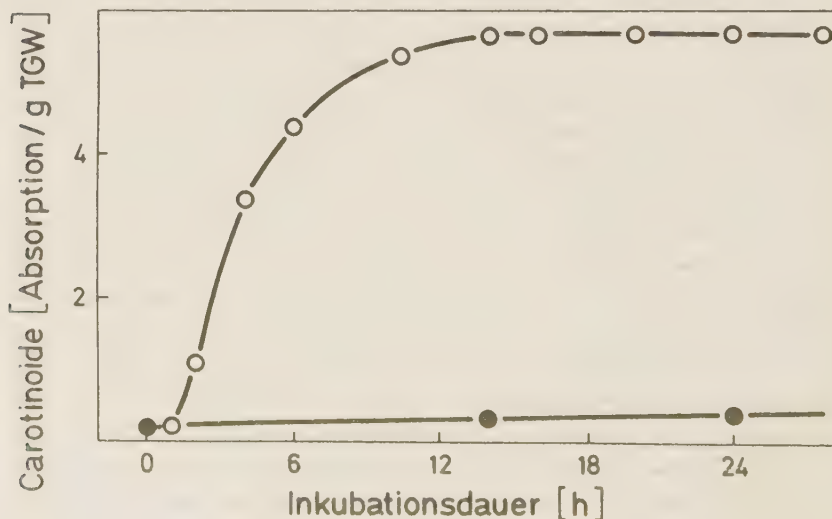


Abb. 4:

Verlauf der Akkumulation von Carotinoiden beim Wildstamm nach Lichtinduktion (O) und im Dunkeln (●). (Rau, unveröffentlicht).

Bei der von Theimer (1968) isolierten Regulationsmutante rd-1 werden schon im Dunkeln große Mengen an Carotinoiden synthetisiert. Licht bewirkt eine Steigerung der Pigmentsynthese über einen Zeitraum von ca. 24 Stunden. Danach verläuft die Synthese in belichteten und unbelichteten Proben parallel (Abb.5).

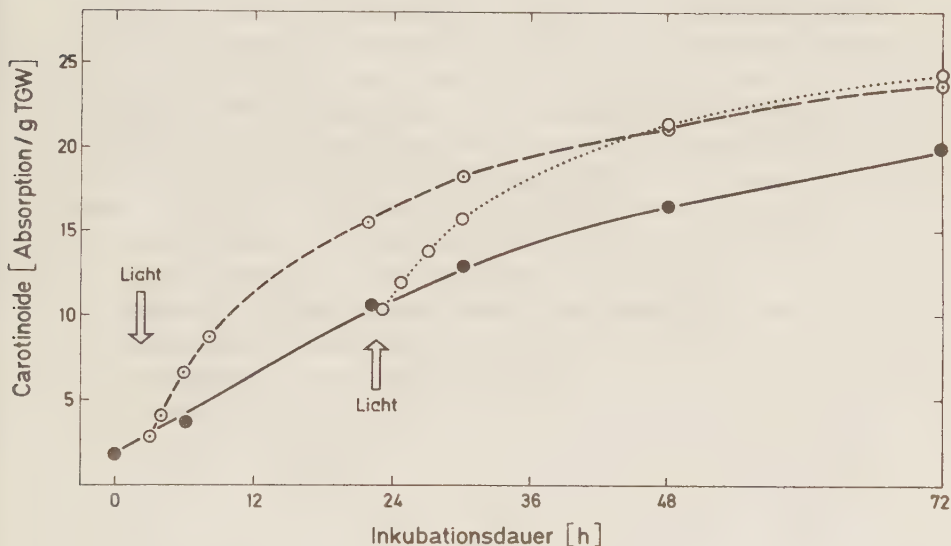


Abb. 5:

Verlauf der Akkumulation von Carotinoiden im Dunkeln (geschlossene Symbole) und nach Belichtung (offene Symbole) bei der Mutante rd-1. Die Belichtung erfolgte nach 2-stündiger (◐) bzw. 24 stündiger (○) Inkubation im Dunkeln. (Rau, unveröffentlicht).

Ziel der im folgenden beschriebenen Versuche war es zu zeigen, in welcher Weise die Akkumulation von Carotinoiden bei den Mutanten car "1202" und car "1009" verläuft.

Dazu wurden Proben beider Mutanten nach einer 2-stündigen

Akkommodation im Dunkeln 30 oder 180 Minuten lang mit Blaulicht bestrahlt und zu verschiedenen Zeiten nach Belichtungsbeginn der Carotinoidgehalt bestimmt.

1.1.1. Die Mutante car "m1202"

In Abb.6 ist der zeitliche Verlauf der Akkumulation gefärbter Carotinoide nach 30- und 180-minütiger Lichtinduktion dargestellt. Die Synthese beginnt mit geringer Geschwindigkeit. Ursache dafür könnte evtl. eine lag-Phase sein, in der ähnlich wie beim Wildstamm die de-novo-Synthese der lichtinduzierten, carotinoidsynthetisierenden Enzyme abläuft. Der Hauptanteil an Carotinoiden wird im Zeitraum von 2 bis 14 Stunden nach Lichtbeginn synthetisiert; danach ist die Pigmentakkumulation abgeschlossen. Unabhängig von der Dauer der Lichtinduktion ist der Verlauf der Carotinoidbildung identisch. Ein Vergleich mit dem Wildstamm zeigt, daß die Carotinoidakkumulation in beiden Organismen ähnlich verläuft. Auf Grund dieser Akkumulationskinetik wurde bei allen Versuchen, bei denen die Induktion ausschließlich mit Blaulicht erfolgte, die Carotinoidbestimmung nach einer Reaktionsdauer von 24h vorgenommen (Endpunktbestimmung).

1.1.2. Die Mutante car "m1009"

Auch bei der phänotypisch weißen Mutante car "m1009" ist die Carotinoidbiosynthese lichtreguliert. In Abb.7 ist die Akkumulationskinetik von Phytoen, dem dominierenden Carotinoid der Mutante car "m1009", nach 30-minütiger Lichtinduktion dargestellt. Es erfolgt eine rasche Synthese bis zu etwa 8 Stunden nach Belichtungsbeginn, dann scheint die Phytoenakkumulation im wesentlichen abgeschlossen zu sein. Im Vergleich zum Wildstamm (Abb.4) (und zu Mutante car "m1202") verläuft die lichtinduzierte Carotinoidbiosynthese bei der Mutante car "m1009" also schneller.

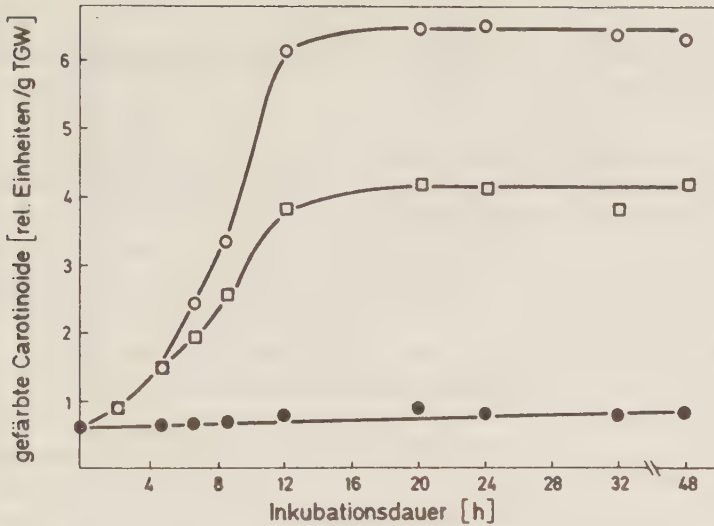


Abb. 6:

Verlauf der Akkumulation von Carotinoiden nach 30- (□) bzw. 180-minütiger (○) Lichtinduktion bei der Mutante car "m1202" und im Dunkeln (●). (Mittelwerte aus 3 Versuchen).

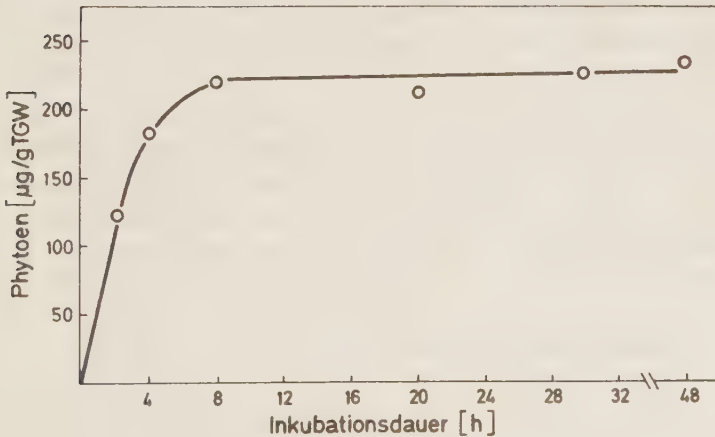


Abb. 7:

Verlauf der Akkumulation von Phytoen nach 30-minütiger Lichtinduktion bei der Mutante car "m1009". (Mittelwerte aus 3 Versuchen).

1.2. Carotinoidmenge unterschiedlich lang belichteter Proben (Dosis-Effekt-Kurve)

In diesem Abschnitt wird dargestellt, wie die induzierte Carotinoidmenge der Mutanten car "m1202" und car "m1009" von der Dauer der Lichtinduktion abhängt. Theimer und Rau (1970) hatten eine Dosis-Effekt-Kurve für den Wildstamm aufgenommen: die synthetisierte Carotinoidmenge steigt logarithmisch mit der Belichtungszeit an. Dabei ergab sich eine Zweiphasigkeit im Kurvenverlauf (Abb.8): Belichtungszeiten länger als 16 Minuten führen zu einer steileren Zunahme der synthetisierten Carotinoidmenge als kürzere Belichtungszeiten.

Bei der von Theimer (1968) isolierten Mutante rd-1 ergab sich eine relativ rasche Sättigung der lichtinduzierten Carotinoidbiosynthese. Orientierende Vorversuche, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, bestätigten die Ergebnisse von Rau (unveröffentlicht), wonach Belichtungszeiten von länger als 1 Minute zu keiner weiteren Steigerung der Pigmentmengen führen.

Um festzustellen, ob die Mutanten car "m1202" und car "m1009" in ihrem Photoperzeptionssystem mehr dem Wildstamm oder der Mutante rd-1 entsprechen, wurden die Dosis-Effekt-Kurven beider Organismen ermittelt.

2 Stunden im Dunkeln akkommodierte Proben wurden unterschiedlich lang mit Blaulicht belichtet, anschließend 24 Stunden lang im Dunkeln weiter inkubiert und dann der Carotinoidgehalt bestimmt, zu einem Zeitpunkt also an dem die Carotinoidsynthese abgeschlossen ist (Endpunktbestimmung) (vgl. Kapitel IV. 1.1.).

1.2.1. Die Mutante car "m1202"

Wie aus Abb.8 ersichtlich ist, hängt auch bei Mutante car "m1202", ähnlich wie beim Wildstamm, die synthetisierte Carotinoidmenge logarithmisch von der Belichtungszeit ab. Eine deutliche Zweiphasigkeit im Verlauf der Dosis-Effekt-Kurve ist

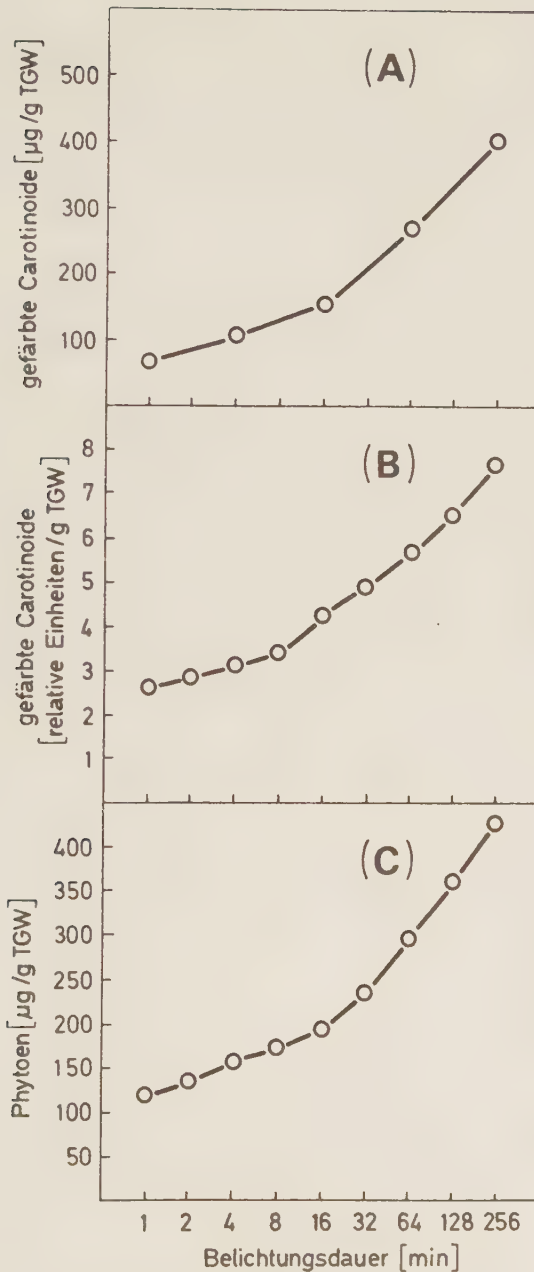


Abb. 8:

Dosis-Effekt-Kurven der Carotinoidsynthese beim Wildstamm (A) (Theimer und Rau, 1970), bei der Mutante car "m1202" (B) und der Mutante car "m1009" (C). (Mittelwerte aus 3 Versuchen).

zu erkennen. Während jedoch beim Wildstamm erst Belichtungszeiten länger als 16 Minuten zu einem Steilerwerden der Dosis-Effekt-Kurve führen, nimmt im Fall der Mutante car "m1202" die Steigung schon bei Belichtungszeiten länger als 8 Minuten zu.

1.2.2. Die Mutante car "m1009"

Aus Abb.8 wird deutlich, daß der Verlauf der Dosis-Effekt-Kurve bei Wildstamm und Mutante car "m1009" identisch ist.

1.3. Pigmentzusammensetzung im Dunkeln und nach Belichtung

Wie in Abschnitt IV. 1.1. und IV. 1.2. beschrieben, sind die Mutanten car "m1202" und car "m1009" in der Lage lichtabhängig Carotinoide zu synthetisieren. Auch bei der von Theimer (1968) isolierten Mutante rd-1, die schon im Dunkeln relativ große Mengen an Carotinoiden akkumuliert, wurde eine verstärkte Carotinoidbiosynthese nach Lichtinduktion festgestellt (Abb.5) (Lang, 1969; Rau, unveröffentlicht). Die drei Mutanten wurden nun an Hand ihrer Carotinoidzusammensetzung charakterisiert und mit dem Wildstamm verglichen.

2 Stunden im Dunkeln akkommodierte Proben wurden 30 Minuten lang mit Blaulicht bestrahlt und anschließend 4 bzw. 21.5 Stunden im Dunkeln inkubiert. Danach wurde die Analyse des Pigmentgemisches vorgenommen. Parallel dazu wurden die entsprechenden, ausschließlich im Dunkeln gehaltenen Kontrollproben untersucht.

1.3.1. Die Mutante car "m1202"

Die Mutante car "m1202" synthetisiert im Dunkeln nur geringe Mengen an Carotinoiden, wobei hauptsächlich Phytoen und dazu wenig ζ -Carotin und Neurosporin gebildet wird (Tab.1). Nach Lichtinduktion kommt es zur verstärkten Synthese von Carotinoiden, wobei vor allem Phytoen, ζ -Carotin und Neurosporin akkumuliert werden.

Tabelle 1:

Carotinoidgehalt in µg/g TGW belichteter und unbelichteter Proben des Wildstammes und der verschiedenen Mutanten. (Mittelwerte aus 3 Versuchen).
 D6.5/D24: nach 6.5- bzw. 24-stündiger Inkubation in Dunkeln;
 L6.5/L24: nach 2-stündiger Akkommodation, 30-minütiger Belichtung und anschließender 4- bzw. 21.5-stündiger Inkubation im Dunkeln.
 + : nur in Spuren vorhanden; N.xanthin = Neurospoxanthin.

	Wildstamm				Mutante rd-1				Mutante car "ml202"				Mutante car "ml009"			
	D6.5	L6.5	D24	L24	D6.5	L6.5	D24	L24	D6.5	L6.5	D24	L24	D6.5	L6.5	D24	L24
Phytoen	0.1	8.8	+	7.9	30.5	73.5	65.7	42.1	9.5	142.1	10.7	168.5	5.7	122.6	6.5	231.5
Phytofluen	-	+	-	0.1	1.3	1.4	1.5	0.3	0.1	5.9	+	12.3	-	+	-	+
ζ -Carotin	1.7	6.2	2.4	1.6	3.6	4.2	3.7	0.5	+	13.6	0.2	23.1	-	+	-	+
Neurosporin	0.8	3.6	3.5	1.7	3.1	4.7	6.2	2.1	+	5.1	0.2	22.9	-	+	-	+
Lycopin	1.6	16.1	2.5	22.7	6.8	10.5	30.4	33.6	-	0.1	-	0.8	-	-	-	-
β -Zeaxarotin	0.6	2.8	1.0	0.9	2.9	1.7	1.7	3.7	-	2.4	-	3.3	-	-	-	-
γ -Carotin	3.0	35.8	4.7	22.6	41.7	67.1	69.8	55.6	-	0.4	-	2.2	-	-	-	-
β -Carotin	-	-	-	0.3	4.0	4.3	4.0	5.3	-	-	-	1.3	-	-	-	-
Torulin	1.8	43.1	2.2	20.7	19.3	24.7	55.9	45.7	-	0.5	-	1.0	-	-	-	-
N.xanthin	3.6	9.3	3.6	121.2	69.2	150.5	181.1	408.3	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	13.2	125.8	19.9	199.7	182.4	342.6	420.0	597.2	9.6	170.1	11.1	233.4	5.7	122.6	6.5	231.6

Mit zunehmender Synthesedauer nimmt der prozentuale Anteil des Phytoens ab: 4 Stunden nach Beginn der Lichtinduktion beträgt der Anteil des Phytoens noch 84%, nach 24 Stunden nur noch 71%, obwohl die Absolutmenge dieser Komponente im entsprechenden Zeitraum zunimmt. Die im Biosyntheseweg (Porter und Lincoln, 1950) (Abb.1) nach dem Phytoen liegenden Carotinoide ζ -Carotin und Neurosporin erscheinen verstärkt mit längerer Inkubationsdauer und zwar zunächst ζ -Carotin und etwas verzögert das durch Dehydrierung daraus entstehende Neurosporin. Diese beiden Komponenten sind für den gelben Phänotyp der Mutante car "m1202" verantwortlich und werden nur noch in äußerst geringem Umfang weitermetabolisiert. Alle im Biosyntheseweg nach Neurosporin einzureihenden und vom Wildstamm synthetisierten Pigmente, mit Ausnahme von Neurosporaxanthin, werden in kleinen Mengen gebildet. Dies weist darauf hin, daß die Mutante car "1202" eine "leaky"-Mutante ist. Eine Analyse der Spektren der einzelnen Carotinoide ergab, daß ζ -Carotin, Neurosporin und β -Zeacarotin in vom Wildstamm abweichenden isomeren Formen oder Gemischen verschiedener Isomeren (Abb.9,10,11) auftreten, welche jedoch als solche noch nicht genauer charakterisiert wurden.

Abb.9:

Absorptionsspektrum von ζ -Carotin isoliert aus dem Wildstamm (1) und der Mutante car "m1202" (2).

Abb.10:

Absorptionsspektrum von Neurosporin isoliert aus dem Wildstamm (1) und der Mutante car "m1202" (2).

Abb.11:

Absorptionsspektrum von β -Zeacarotin isoliert aus dem Wildstamm (1) und der Mutante car "m1202" (2).

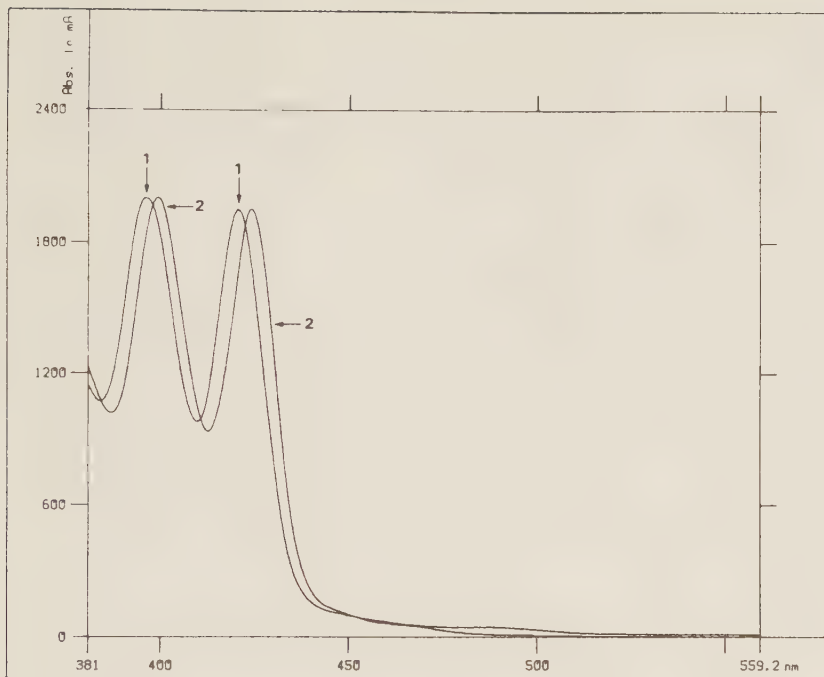


Abb. 9

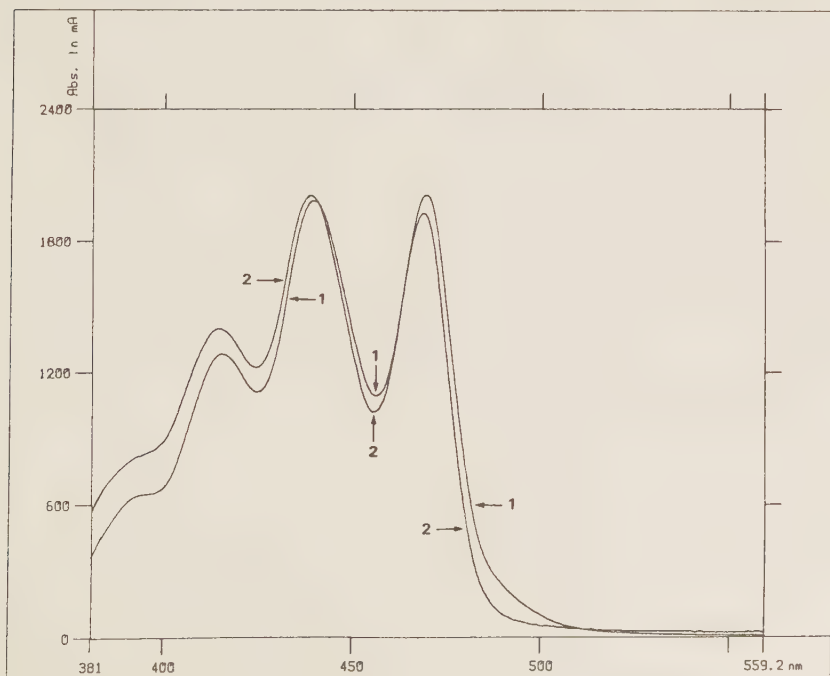


Abb. 10

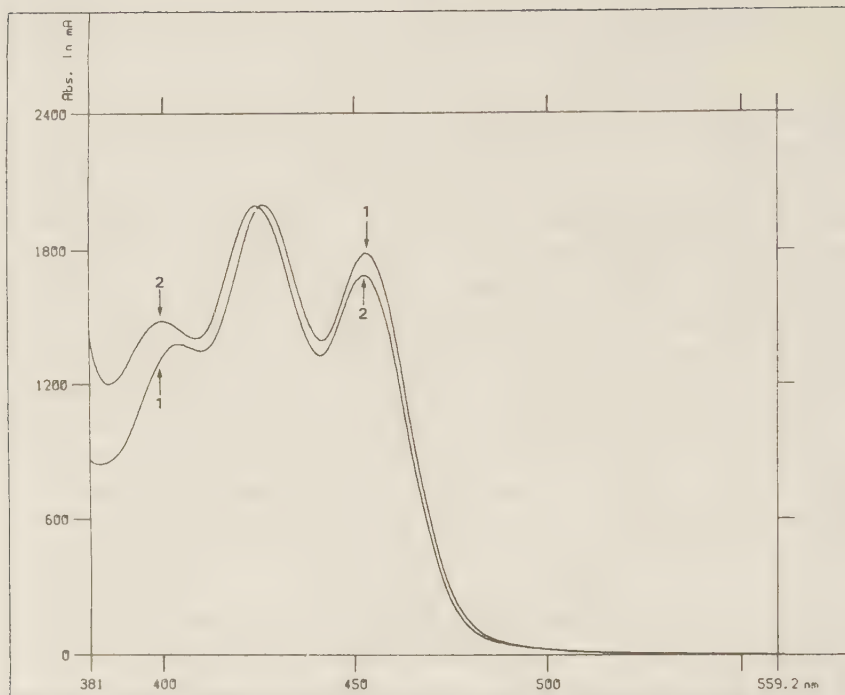


Abb.11

1.3.2. Die Mutante car "m1009"

Die Mutante car "m1009" synthetisiert im Dunkeln nur geringe Mengen an Phytoen; durch Belichtung wird die Synthese von Carotinoiden induziert, die fast ausschließlich zur Akkumulation von Phytoen führt (Tab.1). Sehr geringe Mengen an Phytofluoren und in Spuren auch ζ -Carotin und Neurosporin konnten ebenfalls nachgewiesen werden. Alle anderen, im Biosyntheseweg nach Neurosporin einzureihenden Komponenten wurden nicht gefunden.

1.3.3. Die Mutante rd-1

Die Carotinoidzusammensetzung der als Regulationsmutante diskutierten Mutante rd-1 (Theimer, 1968; Lang, 1969) wurde schon in früheren Untersuchungen von Lang (1969) beschrieben. Die Mutante synthetisiert qualitativ die gleichen Carotinoide wie

der Wildstamm, sodaß ein "genetischer Block" innerhalb des Biosyntheseweges ausgeschlossen werden kann.

In die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen wurde erstmals die Bestimmung von Phytoen und Phytofluon miteinbezogen. In den Tabellen 1 und 2 sind die Ergebnisse zusammengefaßt. Schon im Dunkeln werden große Mengen an Carotinoiden synthetisiert, wobei vorallem Neurosporaxanthin, ζ -Carotin, Torulin und Lycopin akkumulieren. Die Komponenten Phytofluon, ζ -Carotin, Neurosporin, β -Zeacarotin und β -Carotin sind in relativgeringen Mengen vorhanden. Sowohl während der Inkubation im Dunkeln, als auch nach Belichtung ändern sich ihre Mengen nicht signifikant. Durch Belichtung erhöht sich die Gesamtmenge an Carotinoiden. Ein Vergleich 2 Stunden lang akkommodierter, 30 Minuten belichteter und anschließend 4 Stunden im Dunkeln gehaltenen Proben mit den entsprechenden nur im Dunkeln gehaltenen Proben zeigt, daß besonders Phytoen, ζ -Carotin, und Neurosporaxanthin, aber auch in geringerem Maße Lycopin und Torulin nach Lichtinduktion in ihrer Menge zunehmen. Während einer 24-stündigen Inkubation im Dunkeln im Anschluß an die Lichtinduktion nehmen die Mengen an Phytoen und ζ -Carotin wieder ab, dagegen verläuft die Akkumulation von Lycopin, Torulin und vorallem Neurosporaxanthin, welches 24 Stunden nach Belichtung fast 70% der gesamten Carotinoidmenge ausmacht, weiter.

Tabelle 2:

Prozentuale Zusammensetzung des Carotinoidgemisches aus der Mutante rd-1. (Mittelwerte aus 3 Versuchen).

D2/D6.5/D24: nach 2-, 6.5- bzw. 24-stündiger Synthese im Dunkeln;
L6.5/L24: nach 2-stündiger Akkommodation, 30-minütiger
Belichtung und anschließender 4- bzw. 21.5-
stündiger Synthese im Dunkeln.

N.xanthin = Neurosporaxanthin.

Tabelle 2:

	D2	D6.5	D24	L6.5	L24
Phytoen	21.6	16.7	15.6	21.5	7.1
Phytofluen	0.6	0.7	0.4	0.4	0.1
ζ -Carotin	2.6	2.0	0.9	1.2	0.8
Neurosporin	2.6	1.7	0.2	1.4	0.4
Lycopin	4.1	3.7	7.2	3.1	5.6
β -Zeacarotin	0.8	1.6	0.4	0.5	0.6
γ -Carotin	24.6	22.9	16.6	19.6	9.3
β -Carotin	0.02	2.2	1.0	1.8	0.9
Torulin	12.0	10.6	13.3	7.2	7.7
N.xanthin	31.2	37.9	43.3	43.9	68.4

Aus den Ergebnissen wird deutlich, daß bei den Mutanten car "m1202" und car "m1009" die Carotinoidbiosynthese wie beim Wildstamm photoreguliert ist. Die Akkumulation der Pigmente und die Dosis-Effekt-Kurven stimmen weitgehend mit dem Wildstamm überein. Dagegen weisen die Mutanten car "m1202" und car "m1009" eine deutlich andere Pigmentzusammensetzung als der Wildstamm auf ("Biosynthesemutanten"). Die Mutante rd-1 synthetisiert qualitativ dieselben Carotinoide wie der Wildstamm, weist jedoch eine veränderte Regulation der Pigmentsynthese auf. Sie ist als "Regulationsmutante" von den "Biosynthesemutanten" zu unterscheiden.

2. Phototoxische Wirkung von UV-B-Strahlung auf Wildstamm und Mutanten von *Fusarium aquaeductum*

Huber-Willer (1982) und Schrott (1985) fanden, daß mit Blau-licht vorbelichtetes Myzel des Wildstammes von *Fusarium aquaeductum* weniger sensitiv gegenüber UV-A- und UV-B-Strahlung reagiert als nicht vorbelichtetes, also nahezu nicht pigmentiertes Myzel. Eine rein zufällige Korrelierung zwischen Carotinoidgehalt und der Empfindlichkeit gegenüber schädigender Strahlung konnte aber nicht ausgeschlossen werden. Auch ein lichtinduziertes "Regenerationsvermögen" wurde diskutiert. Die im folgenden dargestellten Versuche sollten nun die Frage nach der Schutzfunktion der Carotinoide weiter klären. Die in Kapitel IV. 1. beschriebenen Mutanten schienen geeignet, um zur Lösung dieses Problems beizutragen. Folgende Überlegungen waren dabei Ausgangspunkte:

1. Belichtete Proben der "Biosynthese"-Mutanten weisen gegenüber gleich behandelten Proben des Wildstammes qualitativ bzw. quantitativ andere Carotinoide auf. Eventuelle Unterschiede in der Toleranz gegenüber UV-B-Strahlung konnten eine Folge des unterschiedlichen Schutzes durch die Carotinoide sein. Reagieren Wildstamm und die Mutanten jedoch gleich sensitiv gegenüber kurzwelliger Strahlung, so müßte postuliert werden, daß die Carotinoide die Empfindlichkeit gegenüber Strahlung nicht entscheidend beeinflussen und daß etwas anderes die Ursache für die größere Toleranz blaubelichteten Myzels gegenüber Strahlung ist.

2. Die Mutante rd-1 weist schon im Dunkeln große Mengen an Carotinoiden auf. Würden die Carotinoide das Myzel resistenter gegenüber Strahlung machen, so müßte unbelichtetes Myzel der Mutante rd-1 weniger durch UV-B geschädigt werden als unbelichtetes Myzel des Wildstammes. Andernfalls wäre die Rolle der Carotinoide als effektive Schutzpigmente fraglich. Grundvoraussetzung für diese Überlegungen ist, daß sich Wildstamm und Mutanten nur bezüglich der Carotinoidbiosynthese unterscheiden und nicht andere Genloci zusätzlich mutiert

sind, wodurch die Empfindlichkeit gegenüber Strahlung verändert sein könnte. Da dies jedoch nicht auszuschließen ist, wurden bei allen Versuchen auch Proben untersucht, die die UV-B-Empfindlichkeit des jeweiligen Pilzes ohne Vorbehandlung widerspiegeln.

Als Indikatoren für eine schädigende Wirkung des Lichtes wurden zum einen die Fähigkeit zur Carotinoidsynthese herangezogen, die bei *Fusarium* besonders gut untersucht ist, zum anderen die Zellatmung, die als leicht zu erfassender Parameter Aussagen über die Vitalität des Pilzes zuläßt.

Bei einigen Versuchen (IV. 2.4.) wurde auch die Kapazität für Aufnahme und Einbau von radioaktiv markiertem Methionin untersucht, was eventuell auch Rückschlüsse auf mögliche Angriffs-orte toxisch wirkender Strahlung und zugleich Aussagen über die Wirkungsweise von UV-B zuläßt.

2.1. Vergleich der Empfindlichkeit von Wildstamm und Mutanten für UV-B-Strahlung

Um erste Anhaltspunkte zur Klärung der oben dargestellten Fragen zu erhalten, wurden zunächst an Hand der Kapazität zur Carotinoidsynthese und der Atmung Wildstamm und Mutanten ohne Vorbehandlung auf Empfindlichkeit gegen UV-B-Strahlung vergleichend untersucht. Dazu wurden Proben des Wildstammes, der Mutante rd-1 und der Mutanten car "m1202" und car "m1009" im Dunkeln 2 Stunden an das Puffer-Glucose-Minimalmedium akkommodiert und anschließend verschieden lang mit UV-B einer Intensität von 400mW/m^2 bestrahlt. Zu diesem Zeitpunkt wiesen die Myzelien der einzelnen Stämme einen unterschiedlichen Pigmentierungsgrad auf: der Wildstamm enthielt eine Carotinoidmenge von ca. $10\text{ }\mu\text{g/g}$ Trockengewicht (TGW), die Mutante rd-1 von ca. $90\text{ }\mu\text{g/g}$ TGW und die Mutante car "m1202" ca. $5\text{ }\mu\text{g/g}$ Trockengewicht; dagegen besaß die Mutante car "m1009" keine meßbaren Carotinoidmengen. Sofort nach Beendigung der jeweiligen Bestrahlung wurde die Atmungsrate bestimmt; die Carotinoidbestimmung wurde 48 Stunden später durchgeführt. Diese Zeitspanne war nötig, um die Carotinoid-

synthese nach einer Induktion mit UV-B im Gegensatz zu einer durch Blaulicht induzierten Synthese, welche nach 24 Stunden abgeschlossen ist, vollständig ablaufen zu lassen.

In den Abbildungen sind zum einen die durch die UV-B-Bestrahlung zusätzlich gebildeten Carotinoide in Prozent des jeweiligen Maximalwertes dargestellt, zum anderen der Sauerstoffverbrauch in Prozent der jeweiligen Dunkelkontrolle.

Aus den Ergebnissen (Abb.12 und Abb.13) wird deutlich, daß sich Wildstamm, Mutante rd-1, Mutante car "m1202" und Mutante car "m1009", trotz ihres unterschiedlichen Gehaltes an Carotinoiden nicht drastisch in ihrer Empfindlichkeit gegenüber UV-B-Strahlung unterscheiden.

2.2. Einfluß einer Blauvorbelichtung auf die Reaktion auf UV-B-Strahlung

Ziel war es, den Einfluß einer Blauvorbelichtung, durch die im Myzel Carotinoidsynthese erfolgt, auf die Reaktion auf UV-B-Strahlung zu untersuchen.

Dazu wurden Proben des Wildstammes und der Mutanten car "m1202" und rd-1 mit Blaulicht belichtet, nach definierter Zeit unterschiedlich lang mit UV-B (400mW/m^2) bestrahlt und anschließend über einen bestimmten Zeitraum hinweg im Dunkeln weiterinkubiert. Dabei wurde sofort nach Ende der Bestrahlung mit UV-B und 24 Stunden danach die Atmung gemessen. 48 Stunden nach Ende der UV-B-Bestrahlung wurde die Carotinoidbestimmung durchgeführt (Kapitel II. 3.1.).

In den Abbildungen sind zum einen die während der gesamten Inkubationsdauer synthetisierten Carotinoidmengen als relative Einheiten pro Gramm Trockengewicht (Kapitel II. 3.2.) dargestellt, zum anderen nur die durch die UV-B-Bestrahlung zusätzlich gebildeten Carotinoidmengen, die als Prozent der jeweils maximal durch die UV-B-Einstrahlung gebildeten Carotinoidmenge ausgedrückt werden. Durch die zuletzt genannte Darstellungsweise wird eine evtl. Veränderung des "photo-response" ("response reduction", "response enhancement"; Jagger, 1967) durch eine Blauvorbelichtung berücksichtigt.

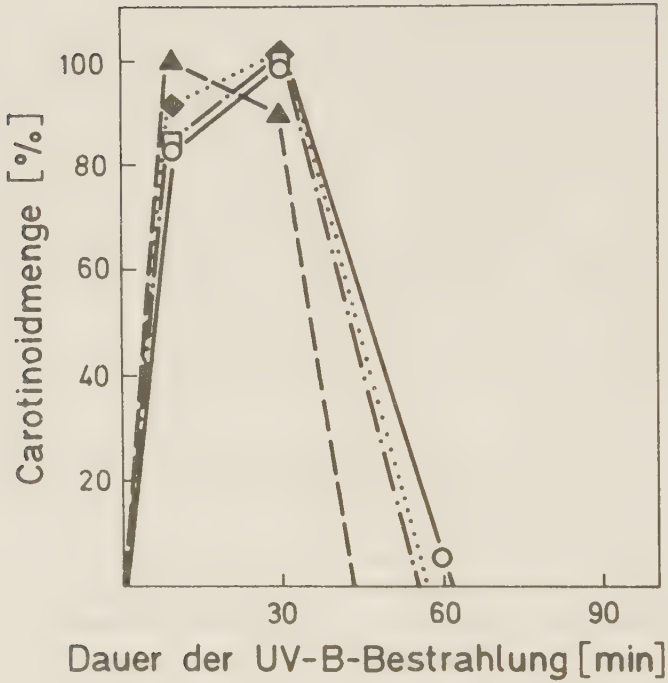


Abb. 12:

Dosis-Effekt-Kurven der Carotinoidsynthese durch Bestrahlung mit UV-B. (Mittelwerte aus 3 Versuchen). Dargestellt sind die durch die Bestrahlung zusätzlich gebildeten Carotinoidmengen in Prozent des jeweiligen Maximalwertes.

- Wildstamm; ▲—▲ Mutante rd-1;
◆—◆ Mutante car "m1202"; □--□ Mutante car "m1009".

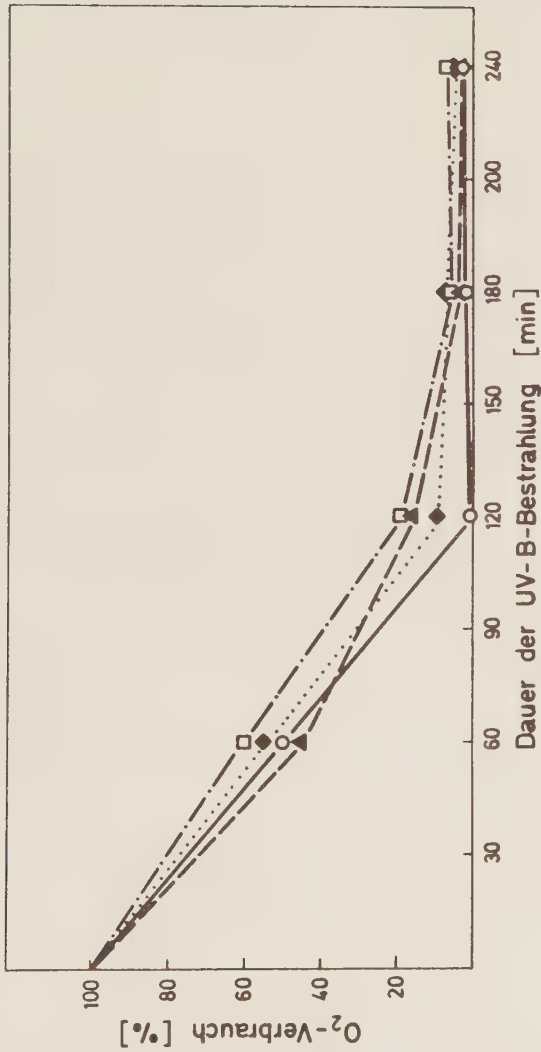


Abb. 13:

Sauerstoffverbrauch in Abhängigkeit von der Dauer der UV-B-Bestrahlung in Prozent der jeweiligen Dunkelkontrolle, gemessen sofort nach Ende der jeweiligen Bestrahlung mit UV-B. (Mittelwerte aus 3 Versuchen).
O—O Wildstamm; ▲—▲ Mutante rd-1;
◆—◆ Mutante car "m1202"; ■—■ Mutante car "m1009".

Die Darstellung der Atmungsrate erfolgt jeweils in Prozent der Dunkelkontrolle; die Blauvorbelichtung hatte auf die Atmung bei den gewählten Lichtintensitäten und Belichtungszeiten keine Wirkung.

2.2.1. Wildstamm

Proben des Wildstammes wurden nach einer 2-stündigen Akkommodation an das Puffer-Glucose-Minimalmedium im Dunkeln verschieden lang mit Blau belichtet bzw. als Kontrollen im Dunkeln weiterinkubiert. Nach Ende der Belichtung wurden alle Proben im Dunkeln weiterinkubiert; während dieser Inkubation werden die durch die Belichtung induzierten Carotinoide synthetisiert. Nach einer Aufenthaltsdauer von insgesamt 6.5 Stunden im Minimalmedium wurde mit der UV-B-Bestrahlung begonnen. Zu diesem Zeitpunkt enthielten die verschieden lang belichteten Proben unterschiedliche Mengen an Carotinoiden auf (Abb.14). Eine eventuell verschiedene Toleranz gegenüber UV-B-Strahlung könnte eine Folge dieser unterschiedlichen Mengen an Carotinoiden sein bzw. der verschiedenen Pigmentzusammensetzung belichteter und unbelichteter Proben (Tab.1) oder eine Konsequenz eines sich parallel zu den Carotinoiden verändernden Faktors.

In Abb.14 sind die Dosis-Effekt-Kurven für die Carotinoidbiosynthese, die sich nach verschieden langer Bestrahlung mit UV-B ergeben, dargestellt. Sie zeigen deutlich, daß unabhängig von der Dauer der Blauvorbelichtung zunächst bei kürzeren UV-B-Bestrahlungszeiten eine zusätzliche Induktion der Carotinoidsynthese erfolgt, bei verlängerten Bestrahlungszeiten jedoch der schädigende Einfluß der kurzwelligen Strahlung überwiegt, was zu einer Abnahme der nach UV-B-Bestrahlung zusätzlich synthetisierten Pigmentmenge führt. UV-B-Bestrahlungszeiten von länger als 180 min. führen sogar zu einem verglichen mit den nicht UV-B bestrahlten Kontrollen geringeren Pigmentgehalt.

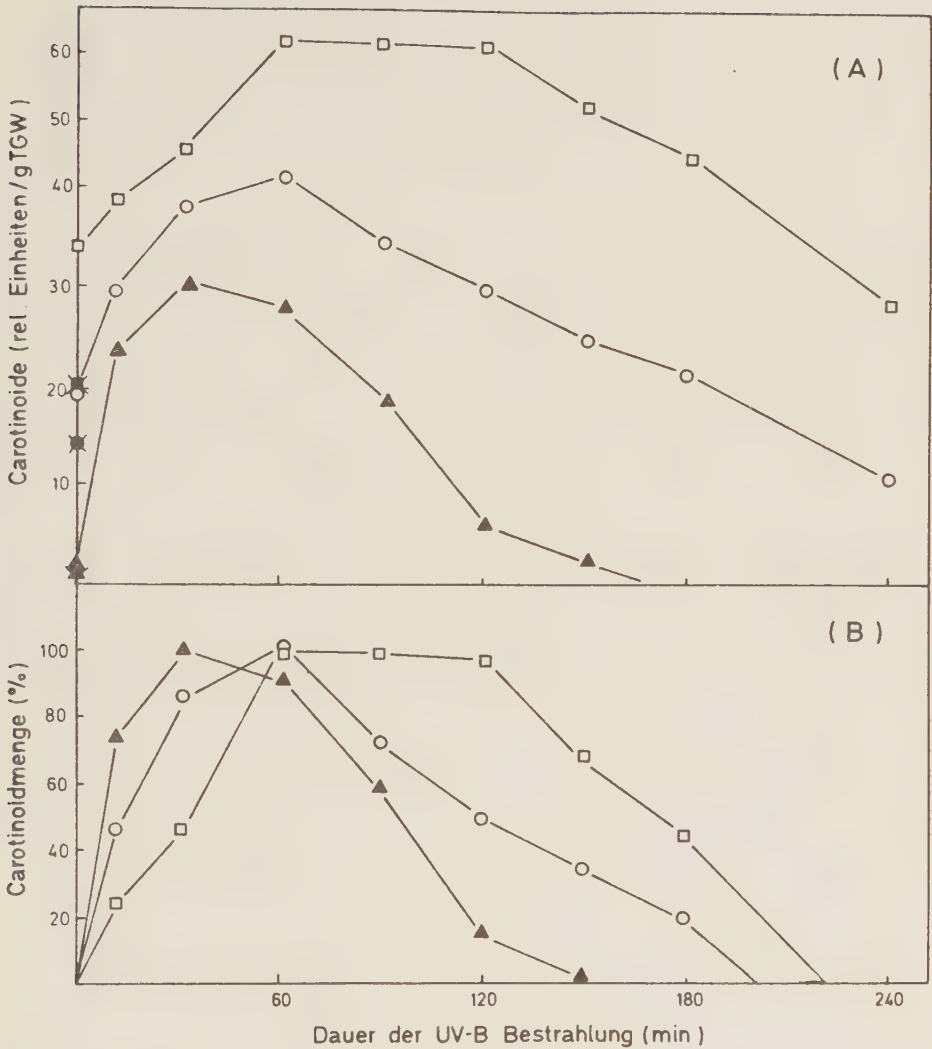


Abb. 14:

Dosis-Effekt-Kurven der Carotinoidsynthese durch Bestrahlung mit UV-B von 0min. (▲), 30min. (○) und 180min. (□) lang vorbe-lichteten Proben des Wildstammes. (Mittelwerte aus 4 Versuchen). Beginn der UV-B-Bestrahlung 4.5h nach Beginn der Vorbelichtung. Dargestellt sind die Gesamt mengen an Carotinoiden in $\mu\text{g/g}$ TGW (A) und die durch die UV-B-Bestrahlung zusätzlich synthetisierten Carotinoidmengen in Prozent des jeweiligen Maximalwertes (B). Zusätzlich dargestellt ist der Carotinoidgehalt der Proben zu Beginn der UV-B-Bestrahlung (Sternsymbole).

Die Lage des "Maximums" in den einzelnen Kurven, das ist die Bestrahlungsdauer, durch die die größte Menge an Carotinoiden durch die UV-B-Einstrahlung induziert wurde, ist deutlich abhängig von der Dauer der Blauvorbelichtung: während bei den nicht vorbelichteten Proben dieses "Maximum" schon nach 30-minütiger UV-B-Einstrahlung erreicht wird, erfolgt bei 30 min. lang vorbelichteten Proben bis zu 60-minütiger UV-B-Bestrahlung noch eine zunehmende Induktion; bei 180 min. lang vorbelichteten Proben erfolgt sogar bis zu 120-minütiger UV-B-Bestrahlung keine Abnahme der Menge an Carotinoiden. Mit steigender Dauer der Blauvorbelichtung verschiebt sich auch der Punkt, an dem überhaupt noch eine zusätzliche Bildung von Carotinoiden durch UV-B-Einstrahlung möglich ist, auf der Zeitachse in Richtung längere Belichtungszeiten.

Parallel zur Carotinoidsynthesefähigkeit wurde der Einfluß von UV-B auf die Atmung untersucht. Die Atmungsrate wurde zu den unter IV. 2.2. beschriebenen Zeiten bestimmt. Abb.15 zeigt die Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauchs verschieden lang vorbelichteter Proben von der Dauer der UV-B-Einstrahlung. Die Messung sofort nach Ende der jeweiligen Bestrahlung ergab, daß unabhängig von der Dauer der Blauvorbelichtung, eine ca. 60-minütige Bestrahlung mit UV-B (400mW/m^2) keine deutliche Schädigung der Atmung bewirkt. Während die Atmung der 180 min. lang vorbelichteten Proben durch Bestrahlungszeiten bis zu ca. 120 min. nicht negativ beeinflußt wird, erfolgt jedoch bei den übrigen Proben eine Reduktion der Atmungsrate, wenn die UV-B-Bestrahlung länger als 60 min. andauert. Dabei liegen die Atmungsraten der 30 min. lang vorbelichteten Proben deutlich über denen der nicht vorbelichteten Proben.

Die Messungen der Atmung 24 Stunden nach Ende der UV-B-Bestrahlung ergaben ebenso, daß mit zunehmender Dauer der Blauvorbelichtung die Atmung weniger durch kurzwellige Strahlung herabgesetzt wird.

Sowohl die Resultate der Atmungsmessung, als auch die der Carotinoidbestimmung machen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Schrott (1985) deutlich, daß mit zunehmender Dauer der Blauvorbelichtung das Myzel des Wildstammes von *Fusarium*

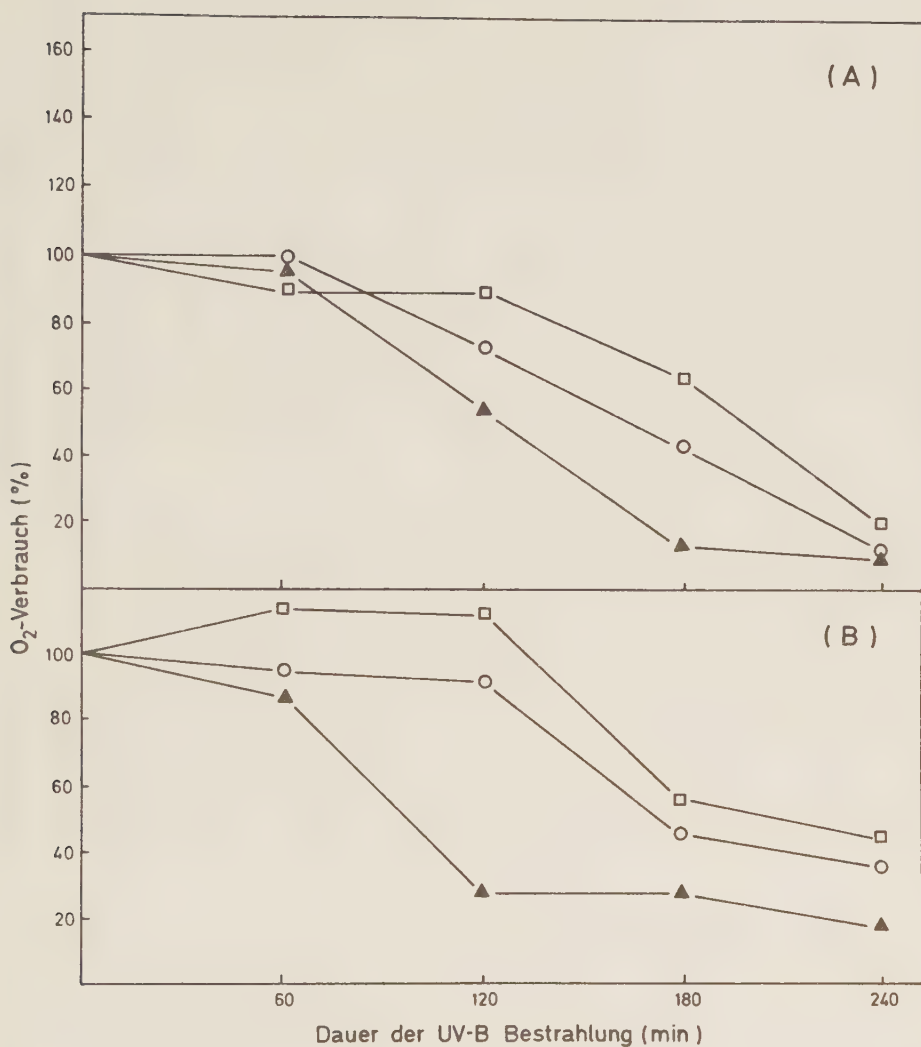


Abb. 15:

Sauerstoffverbrauch in Abhängigkeit von der Dauer der UV-B-Bestrahlung in Prozent der jeweiligen Dunkelkontrolle von 0min. (▲), 30min. (○) und 180min. (□) lang vorbelichteten Proben des Wildstammes gemessen sofort (A) und 24 Stunden (B) nach Ende der jeweiligen Bestrahlung mit UV-B. (Mittelwerte aus 4 Versuchen).

aquaeductuum tatsächlich resistenter gegenüber UV-B-Strahlung ist. Möglicherweise besteht dabei ein direkter Zusammenhang mit dem Grad der Pigmentierung.

Ein zusätzlicher Ansatzpunkt, um die Frage nach der Schutzfunktion der Carotinoide zu klären, war zu untersuchen, ob die Länge der Dunkelphase zwischen Blau- und UV-B-Belichtung von Bedeutung für die Realisation eines nach Blaubelichtung sich manifestierenden Schutzes ist. Würde sich nämlich der schützende Einfluß der Blaubelichtung sofort nach Ende der Belichtung ergeben, so könnte zumindest die Beteiligung induzierbarer Mechanismen, deren Wirkung erst nach einer bestimmten lag-Phase deutlich wird, einschließlich der Carotinoidbiosynthese, ausgeschlossen werden.

Es wurden Proben 2 Stunden lang im Dunkeln akkommodiert, anschließend wurde ein Teil der Proben 30 Minuten mit Blaulicht belichtet, der andere Teil im Dunkeln belassen. Nach Beendigung der Blaubelichtung wurden alle Proben sofort unterschiedlich lang mit UV-B bestrahlt; zu diesem Zeitpunkt haben vorbelichtete und nicht vorbelichtete Proben den gleichen Carotinoidgehalt. Die nach 48 Stunden vorhandenen Carotinoidmengen (Abb.16) zeigen, daß sich die Form der Dosis-Effekt-Kurven der vorbelichteten und nicht vorbelichteten Proben nicht wesentlich unterscheiden. Dieses Resultat deutet zunächst darauf hin, daß die Carotinoide eine Rolle beim Schutz vor UV-B-Strahlung spielen.

2.2.2. Die Mutante car "m1202"

Wie im Abschnitt IV.1.1. beschrieben, werden auch bei Mutante car "m1202" lichtabhängig Carotinoide synthetisiert. Bei gleichen Belichtungsbedingungen unterscheiden sich jedoch die Pigmentmengen und vor allem die Pigmentzusammensetzung von Wildstamm und Mutante car "m1202". Es sollte der Einfluß einer Bauvorbelichtung auf die UV-B-Sensitivität des Myzels der Mutante car "m1202" untersucht und mit dem Wildstamm verglichen werden. Auftretende Unterschiede könnten eventuell Folge des qualitativ und quantitativ unterschiedlichen Carotinoid-

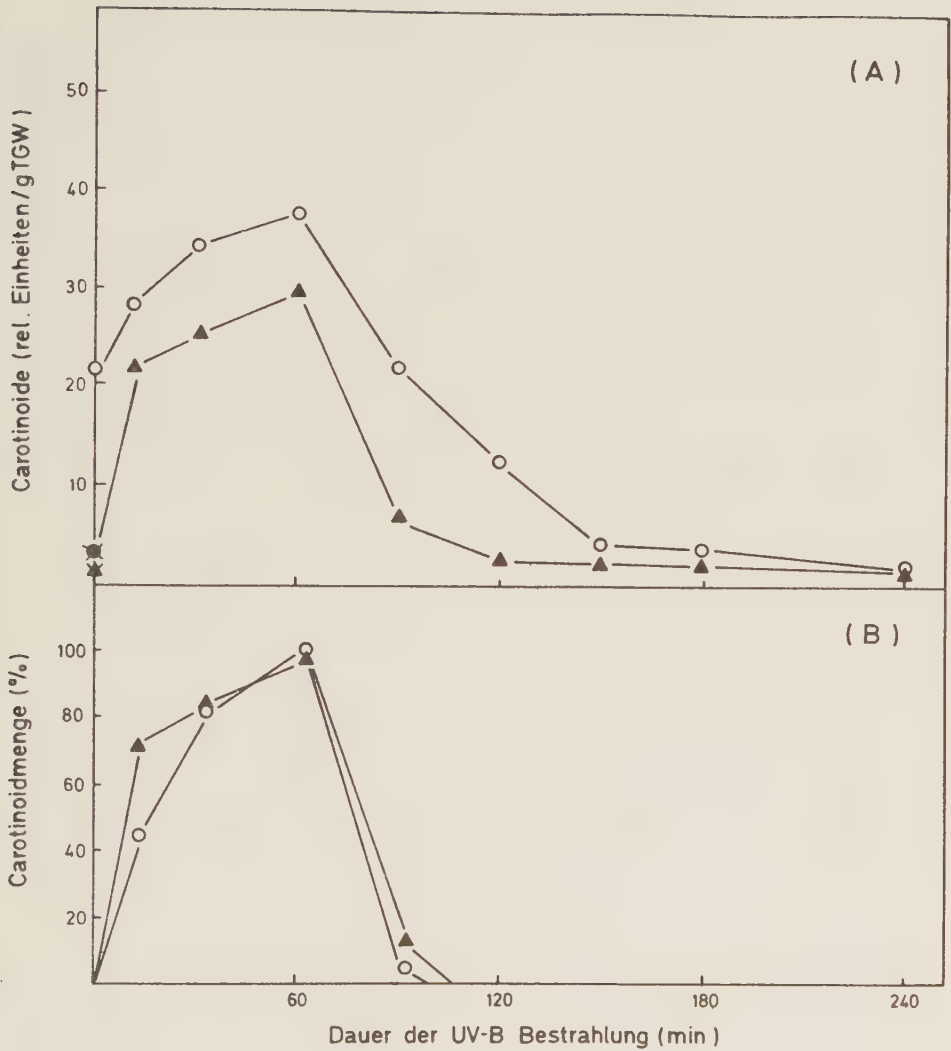


Abb. 16:

Dosis-Effekt-Kurven der Carotinoidsynthese durch Bestrahlung mit UV-B von 0min. (▲) und 30min. (○) lang vorbelichteten Proben des Wildstammes. (Mittelwerte aus 2 Versuchen). Beginn der UV-B-Bestrahlung sofort nach Ende der Vorbelichtung. Dargestellt sind die Gesamtmengen an Carotinoiden in $\mu\text{g/gTGW}$ (A) und die durch die UV-B-Bestrahlung zusätzlich synthetisierten Carotinoidmengen in Prozent des jeweiligen Maximalwertes (B). Zusätzlich dargestellt ist der Carotinidgehalt der Proben zu Beginn der UV-B-Bestrahlung (Sternsymbole).

gehalten sein.

Analog zu den Versuchen mit dem Wildstamm (Kapitel IV. 2.2.1.) wurden Proben der Mutante *car* "m1202" nach 2-stündiger Akkommodation im Dunkeln 30 bzw. 180 min. lang vorbelichtet oder als Kontrolle weiter im Dunkeln belassen, nach einer Inkubationsdauer von insgesamt 6.5 Stunden verschieden lang mit UV-B bestrahlt und anschließend weiter im Dunkeln gehalten. Die Carotinoidbestimmung und die Atmungsmessung erfolgten zu den unter IV. 2.2. angegebenen Zeiten. Zum Zeitpunkt an dem die UV-B-Bestrahlung begann enthielten die 30 und 180 min. lang vorbelichteten Proben die gleichen Mengen an gefärbten Carotinoiden (ca. 22 µg/g TGW) (Abb.17). Dabei war auch die Pigmentzusammensetzung (vgl. Tab.1) identisch. Die Menge an Phytoen, dem dominierenden Pigment, war jedoch deutlich unterschiedlich. So führt eine 30-minütige Belichtung zur Synthese von ca. 178 µg Phytoen/g TGW, eine 180-minütige Belichtung zu ca. 245 µg Phytoen/g TGW. Die unterschiedlichen Mengen an Phytoen könnten somit Ursache für eine eventuell auftretende verschiedene Toleranz gegenüber UV-B-Strahlung bei unterschiedlich lang blau vorbelichteten Proben sein.

Aus Abb.17 ist ersichtlich, daß UV-B, ebenso wie beim Wildstamm, eine zusätzliche Induktion von gefärbten Carotinoiden bewirkt. Bei nicht vorbelichteten Proben erfolgt, wie beim Wildstamm, maximale Carotinoidsynthese durch eine 30-minütige UV-B-Bestrahlung, eine 60-minütige Bestrahlung führt gegenüber der maximal nach UV-B-Bestrahlung gebildeten Menge an Carotinoiden schon zu einer 50%-igen Reduzierung der synthetisierten Carotinoidmenge. 30 min. lang blau belichtete Proben bilden nach einer 30 bis 60-minütigen Bestrahlung mit UV-B die maximale Menge an Carotinoiden, während bei 180 min. lang blau vorbelichteten Proben die Carotinoidmenge bis zu einer UV-B-Bestrahlungsdauer von 60 min. weiter zunimmt. Es wird auch deutlich, daß, im Vergleich zur jeweils nicht UV-behandelten Probe, bei nicht vorbelichteten Proben durch eine Bestrahlung bis zu ca. 100 min. zusätzlich Carotinoide gebildet werden, bei 30 min. lang vorbelichteten Proben dagegen bis zu ca. 120 min. und bei 180 min. lang vorbelichteten Proben sogar

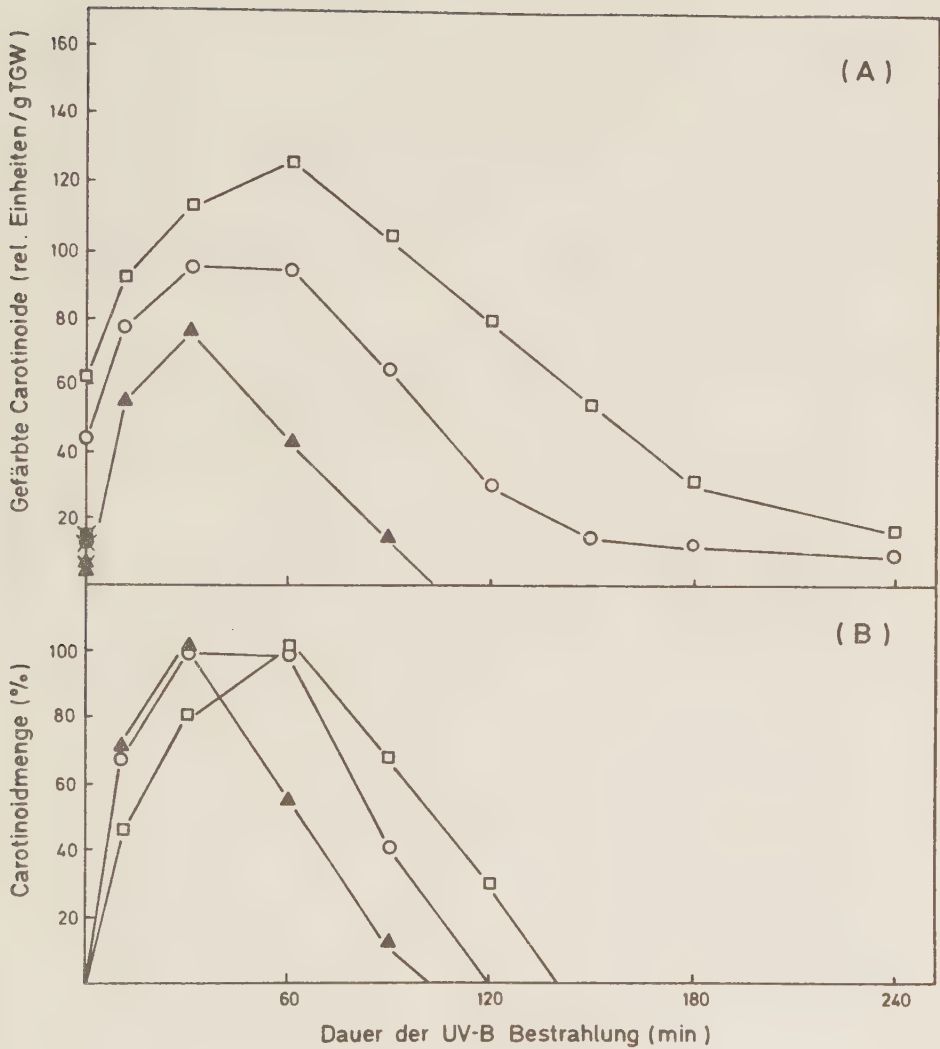


Abb. 17:

Dosis-Effekt-Kurven der Synthese von gefärbten Carotinoiden durch Bestrahlung mit UV-B von 0min. (▲), 30min. (○) und 180min. (□) lang vorbelichteten Proben der Mutante car "m1202". (Mittelwerte aus 3 Versuchen). Beginn der UV-B-Bestrahlung 4.5h nach Beginn der Vorbelichtung. Dargestellt sind die Gesamtmengen an gefärbten Carotinoiden (A) und die durch die UV-B-Bestrahlung zusätzlich synthetisierten Mengen an gefärbten Carotinoiden in Prozent des jeweiligen Maximalwertes (B). Zusätzlich dargestellt ist der Gehalt an gefärbten Carotinoiden zu Beginn der UV-B-Bestrahlung (Sternsymbole).

bis zu ca. 130 Minuten.

Sowohl bei den 30 min., als auch bei den 180 min. lang vorbelichteten Proben kommt es zu einer verglichen mit den ausschließlich blau belichteten Kontrollen geringeren Carotinoidakkumulation durch zu lang andauernde Bestrahlung mit UV-B: bei den 30 min. lang vorbelichteten Proben durch eine Bestrahlung, die länger als ca. 110 min. dauert, bei 180 min. lang vorbelichteten Proben durch eine Bestrahlung, die länger als etwa 130 min. dauert.

Der Einfluß einer Blauvorbelichtung auf die UV-B-Empfindlichkeit des Myzels ist beim Wildstamm ausgeprägter als bei Mutante car "m1202": schon eine 30-minütige Vorbelichtung führt beim Wildstamm zu einer Verschiebung des Punktes, bei dem die maximale Menge an Carotinoiden gebildet wird, zu längeren UV-B-Bestrahlungszeiten. Eine 180-minütige Vorbelichtung führt beim Wildstamm zu einer wesentlich drastischeren Verstärkung dieses Effekts als bei Mutante car "m1202".

Die Ergebnisse der Atmungsmessungen nach entsprechender Behandlung sind in Abb.18 dargestellt. Aus den Werten, die sofort nach dem Ende der jeweiligen UV-B-Bestrahlung ermittelt wurden, geht hervor, daß mit zunehmender Dauer der UV-B-Bestrahlung die Atmungsrate absinkt. Die 120 min. lang mit UV-B behandelten Proben zeigen in Abhängigkeit von der Dauer der Vorbelichtung deutliche Unterschiede in der Atmungsintensität: während die 180 min. lang vorbelichtete Probe noch ca. 75% der Atmungsaktivität der Kontrolle aufweist, erfolgt bei der 30 min. lang vorbelichteten Probe eine Reduktion der Atmung auf 45%, bei der nicht vorbelichteten Probe auf 15%. Bei allen anderen Werten waren die Unterschiede nicht sehr deutlich. Betrachtet man hingegen die Werte, die 24 Stunden nach Ende der UV-B-Bestrahlung bestimmt wurden, so entsprechen diese bei nicht vorbelichteten und 30 min. lang vorbelichteten Proben ungefähr den Werten, die sofort nach Ende der UV-B-Bestrahlung gemessen wurden. Die 180 min. lang vorbelichteten Proben weisen gegenüber nicht und 30 min. lang vorbelichteten Proben eine deutlich höhere Atmung auf (mit Ausnahme der 60-minütigen UV-B-Bestrahlung).

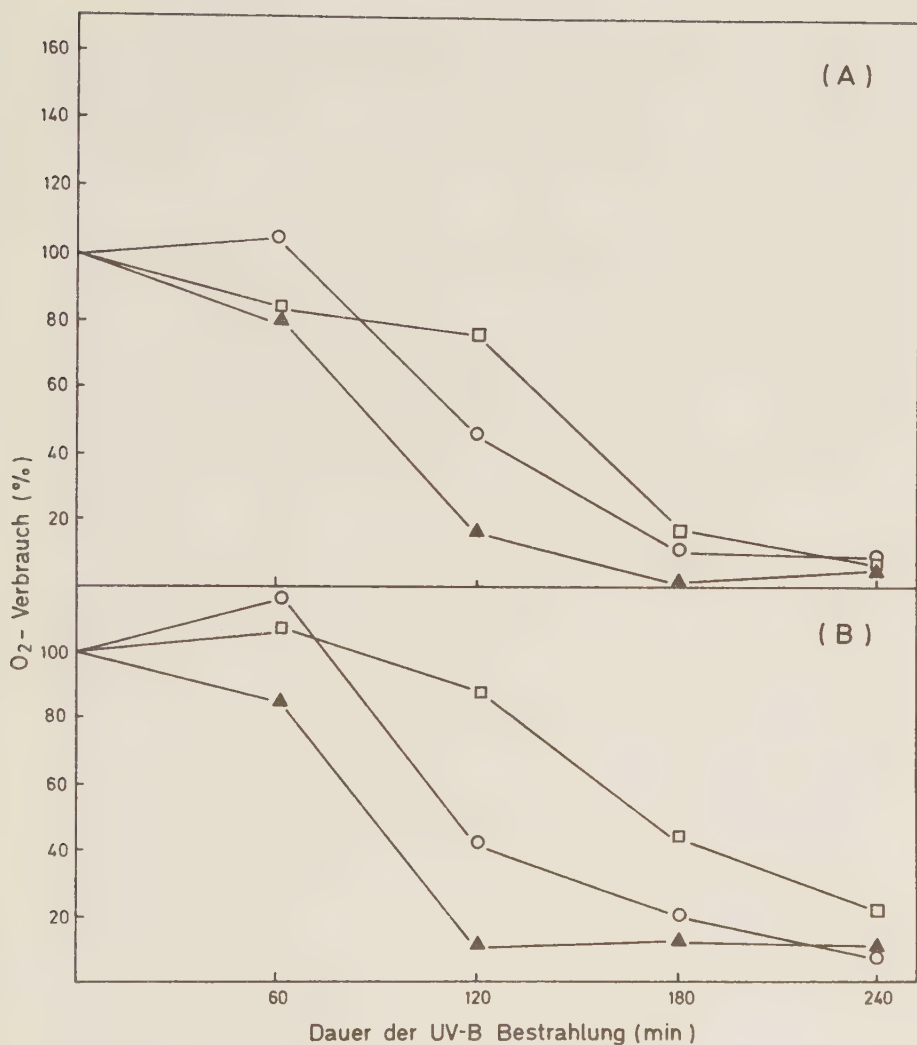


Abb. 18:

Sauerstoffverbrauch in Abhängigkeit von der Dauer der UV-B-Bestrahlung in Prozent der jeweiligen Dunkelkontrolle von 0min (▲), 30min. (○) und 180min. (□) lang vorbelichteten Proben der Mutante car "m1202" gemessen sofort (A) und 24 Stunden (B) nach Ende der jeweiligen Bestrahlung mit UV-B. (Mittelwerte aus 3 Versuchen).

Vergleicht man die mit der Mutante car "m1202" gewonnenen Ergebnisse mit denen des Wildstammes, so wird deutlich, daß unmittelbar nach Ende der jeweiligen UV-Bestrahlung nicht vorbelichtetes Myzel (also 6.5 Stunden akkommodiertes Myzel) der Mutante empfindlicher reagiert als Myzel des Wildstammes. Während sich bei der Mutante nach Beendigung der Bestrahlung nur bei 120 min. lang UV-bestrahlten Proben Unterschiede in der Atmung in Abhängigkeit von der Dauer der Vorbelichtung ergeben, sind diese Unterschiede beim Wildstamm sowohl bei den 120 als auch den 180 min. lang mit UV-B bestrahlten Proben vorhanden. Bei der Atmungsmessung 24 Stunden nach Ende der UV-B-Bestrahlung ergaben sich jedoch beim Wildstamm in Abhängigkeit von der Dauer der Vorbelichtung deutliche Unterschiede in der Atmungsrate bei UV-B-Bestrahlungszeiten von 60 bis 240 min. Bei der Mutante car "m1202" waren deutliche Unterschiede nur bis zu 180-minütiger UV-B-Bestrahlung meßbar. Wie schon die Ergebnisse der Untersuchungen der Carotinoidbiosynthese zeigten, so geht auch aus den Resultaten der Atmungsmessung hervor, daß mit zunehmender Dauer der Vorbelichtung auch bei Mutante car "m1202" die UV-Empfindlichkeit des Myzels abnimmt. Allerdings scheint dieser Einfluß beim Wildstamm ausgeprägter zu sein. Daraus könnte geschlossen werden, daß das Carotinoidgemisch, das vom Wildstamm synthetisiert wird, einen besseren Schutz gewährleistet als das Pigmentgemisch der Mutante car "m1202". Trotz der Ergebnisse, die durch die Untersuchungen an Mutante car "m1202" gewonnen wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, daß durch die Vorbelichtung zusätzlich ein noch unbekannter Prozeß ausgelöst wurde, der zu der erhöhten UV-B-Toleranz beiträgt.

2.2.3. Die Mutante rd-1

Die Mutante rd-1 synthetisiert im Gegensatz zu Wildstamm und der Mutante car "m1202" auch im Dunkeln relativ große Mengen an Carotinoiden (Tab.1); nach Photoinduktion werden Enzyme de novo synthetisiert, die über einen Zeitraum von ca. 24 Stunden

(Lang, 1969; Rau, unveröffentlicht) die Synthese zusätzlicher Carotinoide katalysieren. Anschließend verläuft die Synthese in belichteten und unbelichteten Proben parallel (Abb.5). Ein weiterer Unterschied zu den anderen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Stämmen besteht in der Form der Dosis-Effekt-Kurve (Kapitel IV. 1.2.): schon nach 1-minütiger Belichtung mit Blaulicht (28 W/m^2) tritt eine nahezu 100%-ige Sättigung der lichtinduzierten Carotinoidsynthese ein (Rau, unveröffentlicht).

Im Gegensatz zum Wildstamm und der Mutante car "m1202", bei denen mit zunehmender Dauer der Vorbelichtung die Menge an potentiell schützenden Carotinoiden zunimmt, ist es also bei Mutante rd-1 möglich, Myzelien zu gewinnen, die trotz unterschiedlich langer Blaubelichtung die gleiche Menge an Carotinoiden enthalten. Eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber UV-B-Strahlung verschieden lang vorbelichteter Proben wäre dann nicht auf die Carotinoide zurückzuführen. Analog zu den schon geschilderten Versuchen mit dem Wildstamm und der Mutante car "m1202" wurden Proben der Mutante rd-1 zwei Stunden im Dunkeln an das Minimalmedium akkommodiert, 30 bzw. 180 min. lang mit Blaulicht vorbelichtet oder als Kontrolle weiter im Dunkeln belassen. Nach einer Aufenthaltsdauer von insgesamt 6.5 Stunden im Minimalmedium wurden alle Proben mit UV-B bestrahlt (der Carotinoidgehalt und die Pigmentzusammensetzung der Proben zu diesem Zeitpunkt ist Tabelle 1 zu entnehmen) und anschließend im Dunkeln weiterinkubiert. Die Carotinoidbestimmung und die Atmungsmessung erfolgten zu den unter IV. 2.2. angegebenen Zeiten.

In Abb.19 sind die Ergebnisse der Carotinoidbestimmung dargestellt. UV-B-Bestrahlung wirkt induzierend, wenn auch nur in relativ geringem Maße. Betrachtet man die absolut synthetisierten Mengen an Carotinoiden, so sieht man, daß die Proben, die 180 min. lang vorbelichtet wurden, deutlich mehr Carotinoide nach Induktion mit UV synthetisieren als die nur 30 min. lang vorbelichteten. Mögliche Ursache könnte ein "response enhancement" (Jagger, 1967) für die durch UV-B

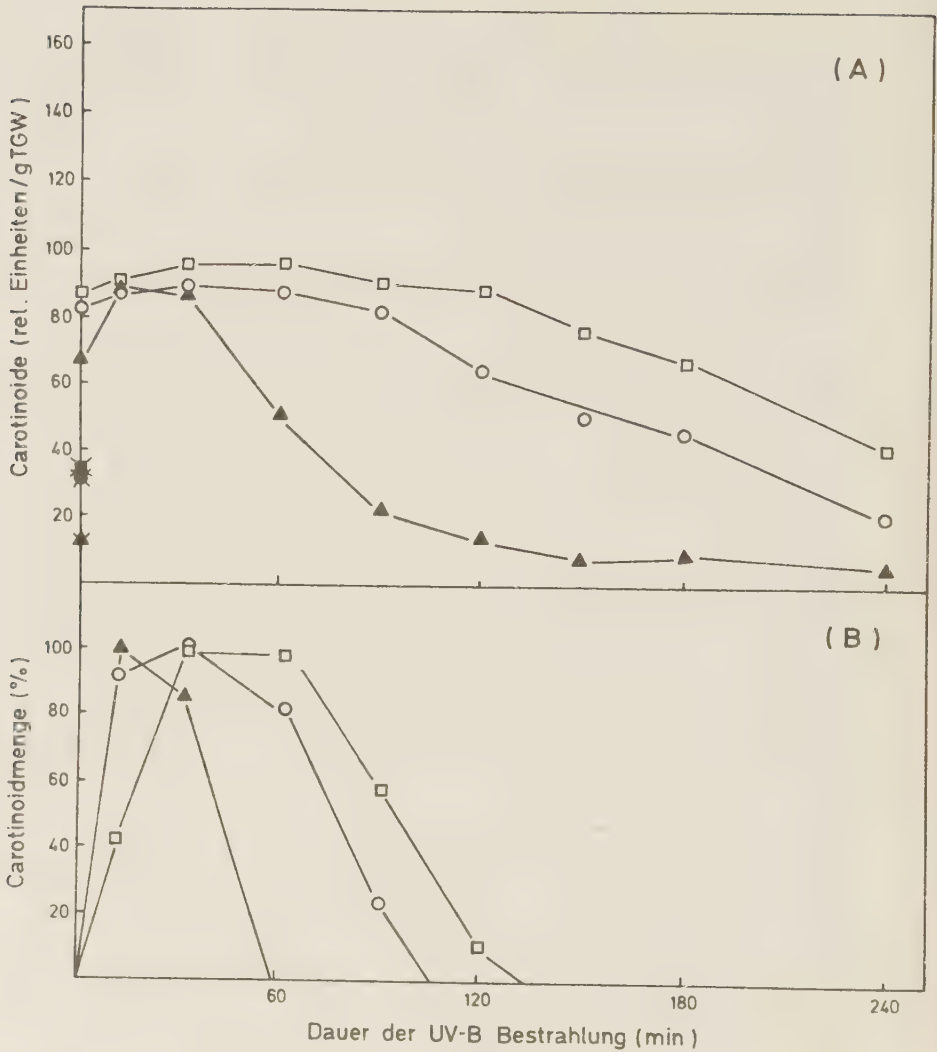


Abb. 19:

Dosis-Effekt-Kurven der Carotinoidsynthese durch Bestrahlung mit UV-B von 0min. (▲), 30min. (○) und 180min. (□) lang vorbelichteten Proben der Mutante rd-1. (Mittelwerte aus 3 Versuchen). Beginn der UV-B-Bestrahlung 4.5h nach Beginn der Vorbelichtung. Dargestellt sind die Gesamt mengen an Carotinoiden in µg/gTCW (A) und die durch die UV-B-Bestrahlung zusätzlich synthetisierten Carotinoidmengen in Prozent des jeweiligen Maximalwertes (B). Zusätzlich dargestellt ist der Carotinoidgehalt der Proben zu Beginn der UV-B-Bestrahlung (Sternsymbole).

induzierte Carotinoidsynthese nach einer Vorbelichtung mit Blaulicht sein.

Bei Betrachtung der einzelnen Dosis-Effekt-Kurven wird deutlich, daß bei nicht vorbelichteten Proben schon nach 10-minütiger Bestrahlung mit UV-B die maximale Menge an Carotinoiden gebildet wird. Dagegen nimmt bei 30 und 180 min. lang vorbelichteten Proben die Menge an synthetisierten Carotinoiden bis zu einer Bestrahlungszeit von ca. 30 min. zu. Bei nicht vorbelichteten Proben führen UV-B-Bestrahlungszeiten von länger als 10 min. zu einer Abnahme der durch UV-B zusätzlich gebildeten Pigmentmenge. 30 min. lang vorbelichtete Proben weisen bei 90-minütiger UV-B-Bestrahlung noch 20%, 180 min. lang vorbelichtete Proben noch 60% der maximalen durch UV-B-Einstrahlung gebildeten Carotinoidmenge auf.

Ein Vergleich mit dem Wildstamm zeigt, daß unabhängig von der Dauer der Vorbelichtung bei Mutante rd-1 durch UV-B-Bestrahlung eine zusätzliche Bildung von Carotinoiden nur durch relativ kurze Bestrahlungszeiten möglich ist. Vergleicht man jedoch die verschiedenen Dosis-Effekt-Kurven der vorbelichteten Proben mit denen der nicht vorbelichteten, so zeigt sich, daß eine 30-minütige Vorbelichtung bei Mutante rd-1 wirksamer ist als beim Wildstamm. Während jedoch beim Wildstamm eine Verlängerung der Vorbelichtung die Toleranz des Myzels gegenüber UV-B-Strahlung noch deutlich erhöht, ist dies bei der Mutante rd-1 nicht der Fall.

Aus Abb.19 geht weiter hervor, daß es bei den nicht und 30 min. lang vorbelichteten Proben ab einer bestimmten UV-Bestrahlungsdauer zu einer meßbaren Photodestruktion von Carotinoiden kommt: die nach UV-Einstrahlung gemessene Menge an Carotinoiden ist geringer als die Mengen, die zu Beginn der UV-B-Bestrahlung vorhanden waren. Ob und in welchem Maß auch bei den 180 min. lang blau belichteten Proben eine Carotinoidzerstörung auftritt kann auf Grund der vorliegenden Ergebnisse nicht gesagt werden, sie ist zumindest nicht meßbar.

Aus den Ergebnissen der Atmungsmessungen (Abb.20) wird deutlich, daß eine Vorbelichtung einen Schutz gegenüber

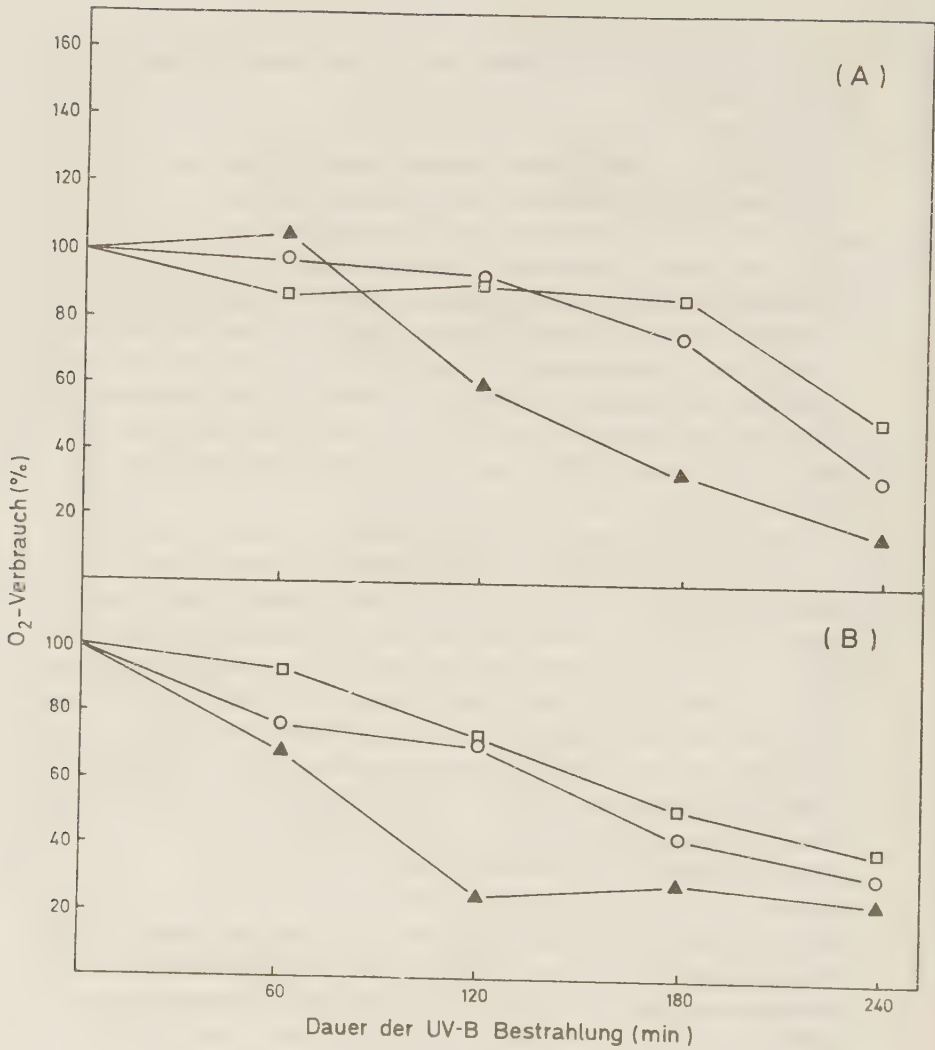


Abb. 20:

Sauerstoffverbrauch in Abhängigkeit von der Dauer der UV-B-Bestrahlung in Prozent der jeweiligen Dunkelkontrolle von 0min. (▲), 30min. (○) und 180min. (□) lang vorbelichteten Proben der Mutante rd-1 gemessen sofort (A) und 24 Stunden (B) nach Ende der jeweiligen Bestrahlung mit UV-B. (Mittelwerte aus 3 Versuchen).

UV-B-Strahlung bewirkt; während die vorbelichteten Proben UV-B-Bestrahlungszeiten bis zu nahezu 180 min. ohne Reduzierung der Atmungsrate überstehen, tritt bei nicht vorbelichteten schon bei Bestrahlungszeiten von länger als 60 min. eine Verringerung der Atmungsrate auf. Die Atmung sinkt im Laufe der sich an die UV-B-Bestrahlung anschließenden 24-stündigen Dunkelinkubation bei allen Proben ab, unabhängig davon, ob eine Vorbelichtung stattfand oder nicht. Im Vergleich zum Wildstamm, bei dem die Dauer der Vorbelichtung deutlich die UV-B-Empfindlichkeit der Atmung beeinflußt, scheint bei der Mutante rd-1 die Dauer der Vorbelichtung keine so entscheidende Rolle zu spielen, wenn auch eine gewisse Tendenz besteht, daß die Atmung der 180 min. lang vorbelichteten Proben etwas weniger empfindlich reagiert als die der 30 min. lang vorbelichteten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß das Myzel der Mutante rd-1 trotz des höheren Gehaltes an Carotinoiden verglichen mit dem Wildstamm keine erhöhte Toleranz gegenüber UV-B-Strahlung aufweist. Der schützende Einfluß einer Vorbelichtung ist aber bei der Mutante rd-1 ausgeprägter, was eventuell eine Folge der größeren Menge an Carotinoiden ist, welche durch die Blaubelichtung bei Mutante rd-1 im Vergleich zum Wildstamm induziert wurde (Tab.1). Die Dauer der Vorbelichtung ist bei Mutante rd-1 im Gegensatz zum Wildstamm und der Mutante car "m1202" nur von geringer Bedeutung. Dies könnte möglicherweise dadurch erklärt werden, daß bei Mutante rd-1 im Unterschied zum Wildstamm und der Mutante car "m1202", unabhängig von der Dauer der Vorbelichtung, zum Zeitpunkt der UV-B-Bestrahlung qualitativ und quantitativ dieselbe Menge an schützend wirkenden Carotinoiden bei den verschiedenen lang vorbelichteten Proben vorliegt. Die Tatsache, daß dennoch eine geringfügige Abnahme der UV-Empfindlichkeit mit zunehmender Dauer der Vorbelichtung bei Mutante rd-1 festgestellt werden konnte, legt die Vermutung nahe, daß neben der Bildung von Carotinoiden noch andere durch eine Blaubelichtung ausgelöste Prozesse eine Rolle beim Schutz vor kurzweiliger Strahlung spielen.

Um weitere Hinweise dafür zu gewinnen, wurde folgender Ver-

suchsansatz gewählt, der unbedingt in Zusammenhang mit den unter IV. 2.3. beschriebenen Ergebnissen zur Rolle der Akkommodation betrachtet werden muß: Proben der Mutante rd-1 wurden 30 min. lang blau belichtet und dann 4 Stunden lang im Dunkeln weiterinkubiert. Während dieser Zeit wurden Carotinoide synthetisiert (ca. 340 µg/g TGW). Anschließend wurden die Proben mit UV-B bestrahlt. Parallel dazu wurden Proben 24 Stunden lang nur im Dunkeln gehalten; dies führte zur Synthese von ca. 420 µg Carotinoiden/g TGW (Pigmentzusammensetzung siehe Tab.2). Danach wurden auch diese Proben mit UV-B bestrahlt. Die Carotinoidbestimmung erfolgte 24 Stunden nach Ende der jeweiligen Bestrahlung, die Atmungsmessung wurde sofort und 24 Stunden nach Ende der jeweiligen UV-B-Bestrahlung vorgenommen. Wie oben beschrieben, führt eine Vorbelichtung zu einer erhöhten Toleranz des Pilzes gegenüber UV-B-Strahlung. Wären dafür ausschließlich die Carotinoide verantwortlich (und nicht zusätzlich ein anderer, sich parallel verändernder Faktor), so mußte unter den eben beschriebenen Versuchsbedingungen eine, verglichen mit den vorbelichteten Proben, höhere Toleranz der 24 Stunden lang im Dunkeln inkubierten Proben nachweisbar sein, weil diese einen höheren Gehalt an Carotinoiden aufweisen. Zudem weisen sie schon durch ihre längere Akkommodation im Minimalmedium eine geringere UV-Sensitivität auf (siehe Kapitel IV.2.3.).

Die Ergebnisse, die sich aus den Messungen der Atmungsrate ergaben, zeigt Abb.21. Die nicht vorbelichteten Proben weisen bis zu 120-minütiger UV-B-Bestrahlung sofort nach Ende der Bestrahlung eine gegenüber der Kontrolle erhöhte Atmung auf. Verlangerte Bestrahlungszeiten führen zu einer Reduzierung der Atmungsintensität. Während der nachfolgenden 24-stündigen Inkubation im Dunkeln kommt es zu einem deutlichen Absinken der Atmungsrate, unabhängig von der Dauer der UV-B-Bestrahlung. Anders dagegen verhalten sich die vorbelichteten Proben. Bei ihnen tritt zwar ebenfalls eine Schädigung bei UV-B-Bestrahlungszeiten von länger als 120 min. auf, im Gegensatz zu den nicht vorbelichteten Proben bleibt die Atmungs-

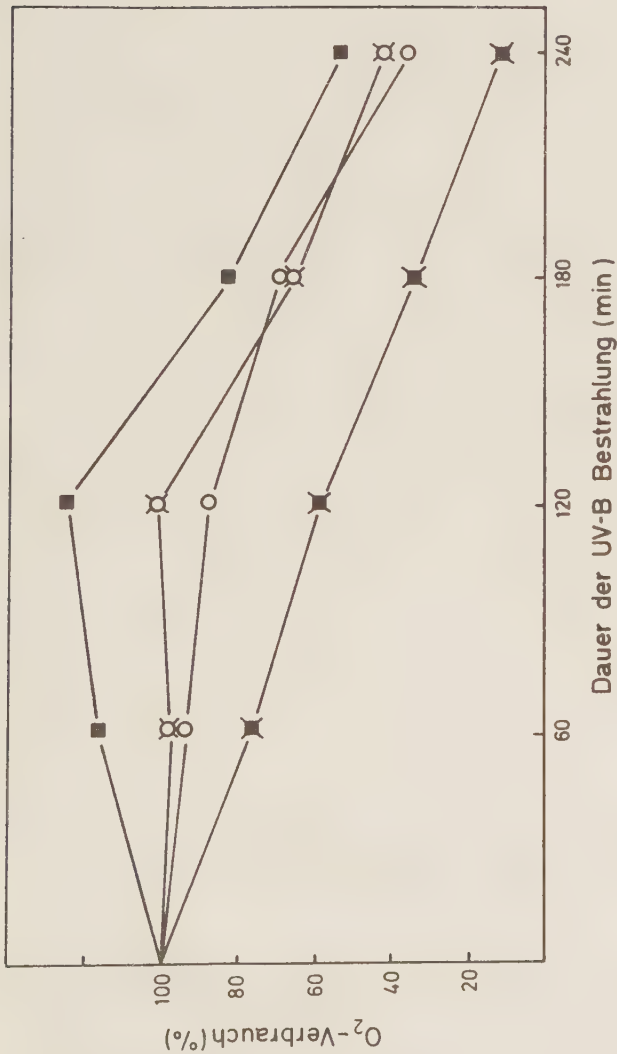


Abb. 21:

Sauerstoffverbrauch in Abhängigkeit von der Dauer der UV-B-Bestrahlung in Prozent der jeweiligen Dunkelkontrolle von 2h lang akkommodierten, dann 30min. lang vorbelichteten und anschließend 4h lang im Dunkeln inkubierten Proben (○, ⊗) und bei 24h lang akkommodierten Proben der Mutante rd-1 (■, ●) sofort durch Ende der jeweiligen Bestrahlung mit UV-B (□, ⊠) bzw. 24h (⊗, ⊠) danach. (Mittelwerte aus 2 Versuchen).

rate während der sich anschließenden 24-stündigen Dunkelinkubation mehr oder weniger konstant und liegt sogar deutlich über der der entsprechenden nicht vorbelichteten Probe.

Diese Ergebnisse zeigen also, daß die vorbelichteten Proben trotz des geringeren Carotinoidgehaltes und der kürzeren Akkommodationszeit (Kapitel IV. 2.3.) bezüglich der Atmung weniger sensitiv gegenüber UV-B reagieren als 24 Stunden lang akkommodierte Proben.

Dieselbe Tendenz ergibt sich auch aus den Untersuchungen zur Carotinoidsynthesefähigkeit (Abb.22). Sie zeigen, daß die vorbelichteten Proben nach 30-minütiger Bestrahlung mit UV-B die maximale Carotinoidmenge synthetisieren und nach 90-minütiger Bestrahlung noch 40% des Maximalwertes bilden. Dagegen kommt es bei den nicht vorbelichteten Proben schon nach 10-minütiger Bestrahlung zur Synthese der maximalen Carotinoidmenge, während nach 90-minütiger Bestrahlung keine zusätzlichen Carotinoide mehr gebildet werden. Bestrahlungszeiten von länger als 180 Minuten hemmen bei belichteten und unbelichteten Proben die Carotinoidsynthese vollständig.

Aus den vorliegenden Resultaten kann geschlossen werden, daß die durch eine Vorbelichtung mit blauem Licht erzielte größere Toleranz gegenüber UV-B-Strahlung nicht nur eine Wirkung der Carotinoide ist, sondern daß auch noch ein oder mehrere Faktoren durch die Vorbelichtung verändert werden, die dann im Zusammenwirken mit den Carotinoiden für eine geringere UV-Sensitivität verantwortlich sind.

2.3. Phototoxische Wirkung von UV-B-Strahlung auf Carotinoidsynthesefähigkeit und Atmung in Abhängigkeit von der Akkommodationsdauer

Aus den bisher gewonnenen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß neben dem Gehalt an Carotinoiden noch andere Faktoren die Empfindlichkeit des Myzels gegenüber schädigender UV-B-Strahlung beeinflussen. Einer dieser Faktoren könnte

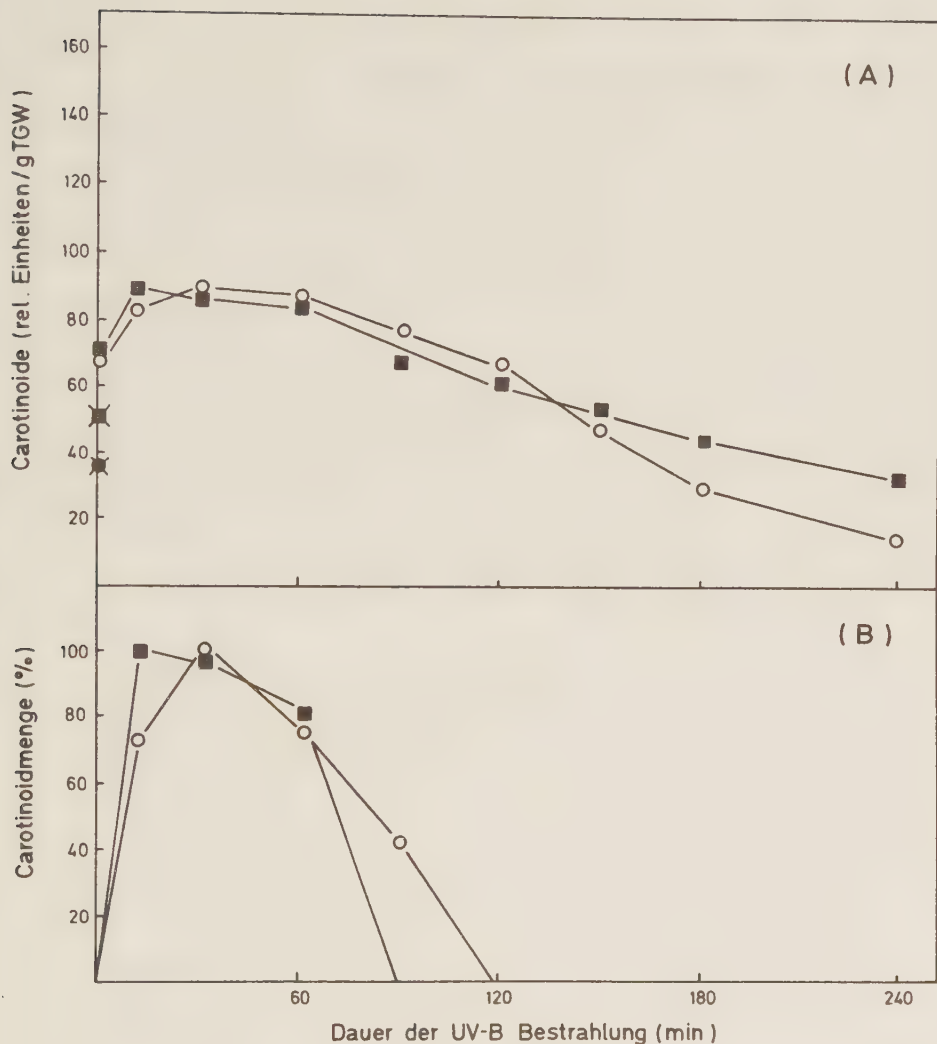


Abb. 22:

Dosis-Effekt-Kurven der Carotinoidsynthese durch Bestrahlung mit UV-B von 2h lang akkommodierten, dann 30min. lang vorbeleuchteten und anschließend 4h lang im Dunkeln inkubierten Proben (○) und bei 24h (■) lang akkommodierten Proben der Mutante rd-1. (Mittelwerte aus 2 Versuchen). Dargestellt sind die Gesamtmengen an Carotinoiden in $\mu\text{g}/\text{TGW}$ (A) und die durch die UV-B-Bestrahlung zusätzlich synthetisierten Carotinoidmengen in Prozent des jeweiligen Maximalwertes (B). Zusätzlich dargestellt ist der Carotinoidgehalt der Proben zu Beginn der UV-B-Bestrahlung (Sternsymbole).

der physiologische Zustand des Myzels sein. Huber-Willer (1982) konnte zeigen, daß die phototoxische Wirkung von UV-A-Strahlung vom physiologischen Zustand des Myzels abhängig ist, und daß dabei das länger an die "step-down"-Bedingungen angepaßte ("akkommodierte") Myzel des Wildstammes resistenter war als das nicht akkommodierte. Deshalb wurde geprüft, ob eine Verlängerung der Akkommodationsdauer auch eine verstärkte Resistenz gegenüber UV-B-Strahlung bewirkt. Um dabei zwischen diesem Faktor und der Rolle der Carotinoide unterscheiden zu können, wurden die Versuche mit der Mutante rd-1, die während einer verlängerten Akkommodationszeit größere Mengen von Carotinoiden akkumuliert, mit dem Wildstamm, der im Dunkeln nur geringe Mengen an Carotinoiden bildet, und mit der Mutante car "m1009", welche im Dunkeln nahezu keine Carotinoide synthetisiert (Tab.1), durchgeführt.

2.3.1. Die Mutante rd-1

Proben der Mutante rd-1 wurden 2 bzw. 24 Stunden lang im Dunkeln akkommodiert und anschließend verschieden lang mit UV-B (400mW/m²) bestrahlt. Die Carotinoidbestimmung erfolgte 24 Stunden nach Ende der UV-B-Bestrahlung, die Atmung wurde sofort nach Ende der jeweiligen Bestrahlung, sowie 24 Stunden danach gemessen.

Zum Zeitpunkt der UV-B-Bestrahlung hatten die 2 Stunden akkommodierten Proben einen Carotinoidgehalt von ca. 170 µg/g TGW, die 24 Stunden akkommodierten Proben einen von ca.

420 µg/g TGW. Auch die Zusammensetzung des Pigmentgemisches war unterschiedlich (Tab.2), vorallem die Anteile an Phytoen, γ-Carotin und Neurosporaxanthin weichen deutlich voneinander ab.

Die Dosis-Effekt-Kurven der Carotinoidsynthese zeigt Abb.23; zusätzlich ist der Verlauf der Carotinoidbiosynthese während der UV-Bestrahlung dargestellt.

Bei nur 2-stündiger Akkommodation kommt es schon während einer 10-minütigen Bestrahlung mit UV-B zu einer Abnahme des Carotinoidgehaltes, also zu einer Photodestruktion von

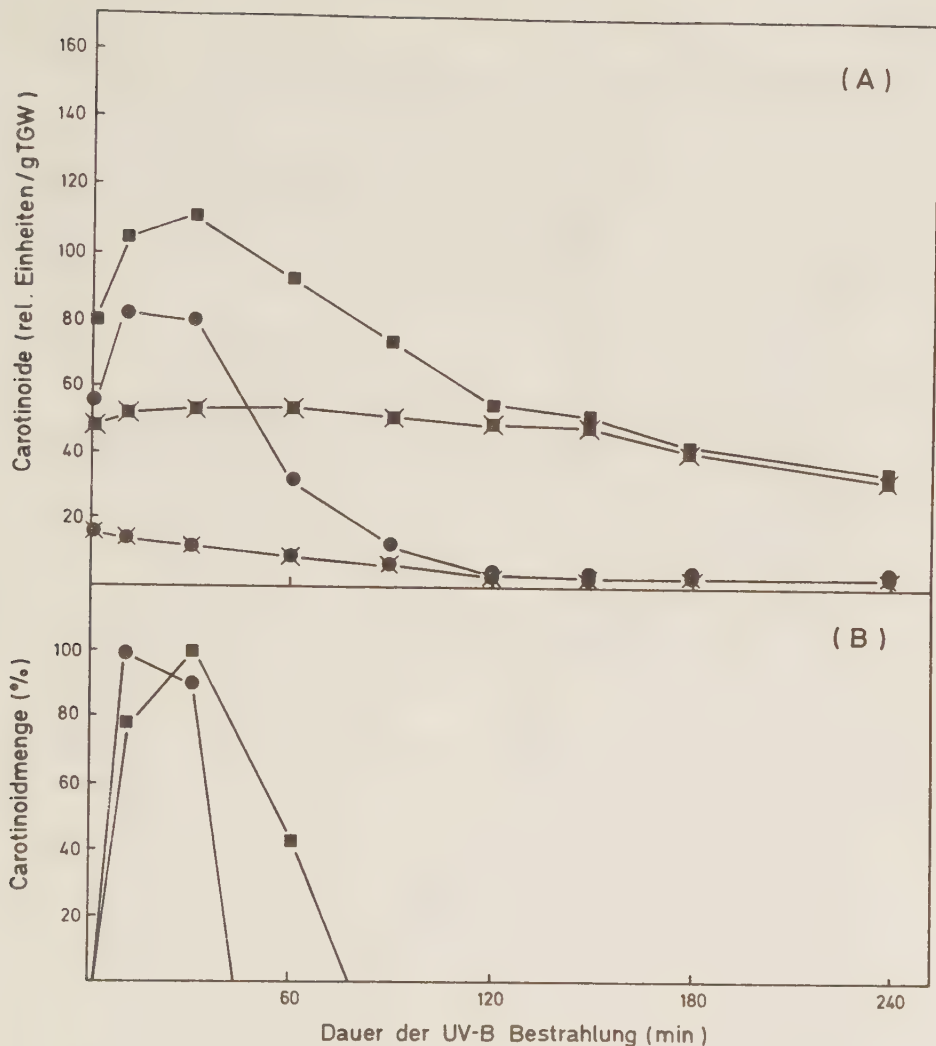


Abb. 23:

Dosis-Effekt-Kurven der Carotinoidsynthese durch Bestrahlung mit UV-B von 2h (●) lang und 24h (■) lang akkommodierten Proben der Mutante rd-1. (Mittelwerte aus 3 Versuchen). Dargestellt sind die Gesamtmengen an Carotinoiden in µg/TGW (A) und die durch die UV-B-Bestrahlung zusätzlich synthetisierten Carotinoidmengen in Prozent des jeweiligen Maximalwertes (B). Zusätzlich dargestellt ist der Carotinoidgehalt der Proben zu Beginn und während der UV-B-Bestrahlung (Sternsymbole).

Carotinoiden, welche mit Fortdauer der Bestrahlung verstärkt erfolgt. Bei 24 Stunden lang akkommodierten Proben ist die Pigmentzerstörung weniger drastisch, so daß es durch die gleichzeitig ablaufende Carotinoidsynthese sogar noch zu einer weiteren, wenn auch nur geringfügigen Zunahme des Carotinoidgehaltes kommt. Es wird deutlich, daß selbst eine 240-minütige Bestrahlung mit UV-B nicht zu einer völligen Zerstörung von Carotinoiden führt.

Das Maximum der Dosis-Effekt-Kurve wird mit zunehmender Dauer der Akkommodation auf der Zeitachse in Richtung längerer Bestrahlungszeiten verschoben. Die maximale Carotinoidmenge wird bei den 2 Stunden lang akkommodierten Proben schon durch 10-minütige Bestrahlung erzielt; Bestrahlungszeiten länger als 30 min. führen zu einem raschen Rückgang der zusätzlich durch die UV-Bestrahlung gebildeten Carotinoidmenge. Bei den 24 Stunden lang akkommodierten Proben wird die maximale Carotinoidmenge durch UV-B-Bestrahlungszeiten von ca. 30 min. erreicht. Eine 60-minütige Bestrahlungsdauer führt noch zu einer ca. 40%-igen Carotinoidsynthese bezogen auf den Maximalwert.

Abb.24 zeigt den Sauerstoffverbrauch 2 Stunden und 24 Stunden lang akkommodierter Proben in Abhängigkeit von der Dauer der UV-B-Bestrahlung. Im Vergleich zu den nur 2 Stunden lang akkommodierten Proben, die schon durch 60-minütige Bestrahlung mit UV-B gravierend in ihrer Atmung gehemmt werden, zeigen sich die 24 Stunden lang akkommodierten deutlich weniger geschädigt. Letztere weisen sogar sofort nach Ende der 60- bzw. 120-minütigen UV-Bestrahlung eine erhöhte Atmungsrate auf; dabei könnte es sich um eine Art Streßatmung handeln. Bestrahlungszeiten, die länger als 180 min. sind, führen zu einer Hemmung der Atmung. Im Laufe der sich anschließenden 24-stündigen Dunkelinkubation sinkt die Atmungsrate bei allen Proben ab; sie ist bei 24 Stunden lang akkommodierten Proben dann aber immer noch höher als die der 2 Stunden lang akkommodierten Proben.

Die Dauer der Akkommodation beeinflusst, wie die Ergebnisse zeigen, die Reaktion der Mutante rd-1 gegenüber UV-B-Strahlung

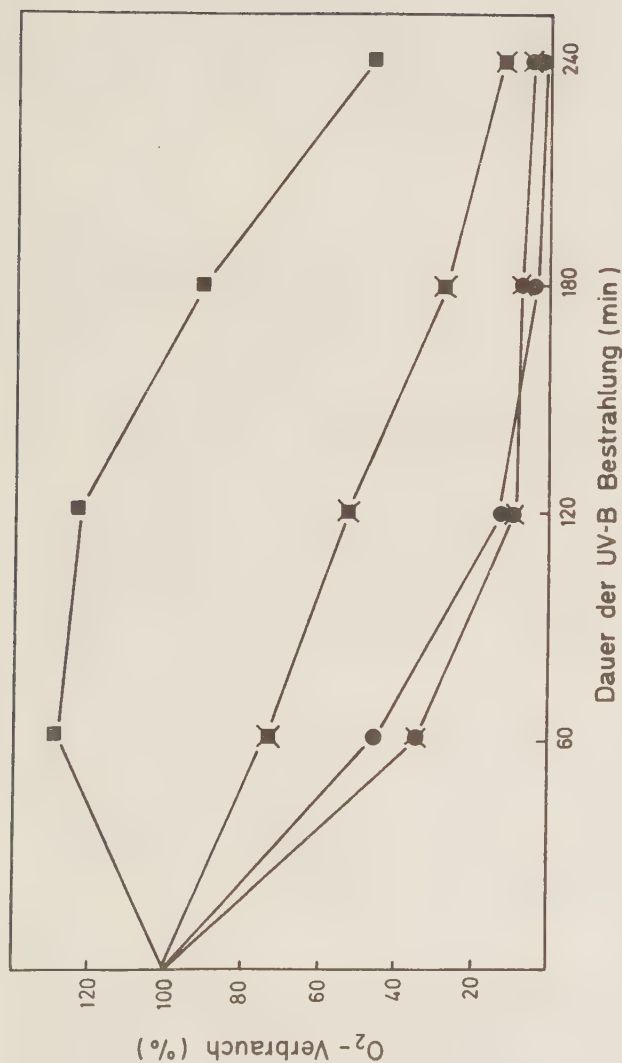


Abb. 24:

Sauerstoffverbrauch in Abhängigkeit von der Dauer der UV-B-Bestrahlung in Prozent der jeweiligen Dunkelkontrolle von 2h (●, ✕) lang und 24h (■, ✕) lang akkommodierten Proben der Mutante rd-1 gemessen sofort (●, ■) und 24h (✕, ✕) nach Ende der jeweiligen UV-B-Bestrahlung. (Mittelwerte aus 3 Versuchen).

deutlich. Inwieweit dies jedoch allein eine Funktion der während der verlängerten Akkommodationsdauer gebildeten Carotinoide ist, oder ob während dieser Zeit noch andere Prozesse ablaufen, die eventuell in Zusammenarbeit mit den Carotinoiden zu einer höheren Toleranz gegenüber Strahlung führen, sollte durch die im folgenden beschriebenen Versuche mit dem Wildstamm und der Mutante car "m1009" geklärt werden.

2.3.2. Wildstamm

Proben des Wildstammes, der im Dunkeln nur geringe Mengen an Carotinoiden synthetisiert (Tab.1) wurden 2 bzw. 24 Stunden lang akkommodiert und anschließend unterschiedlich lang mit UV-B bestrahlt. Die Carotinoidbestimmung und die Atmungsmessung erfolgten zu den unter IV.2.3.1. angegebenen Zeiten. In Abb.25 sind die Dosis-Effekt-Kurven der durch UV-B induzierten Carotinoidsynthese dargestellt. Unabhängig von der Dauer der Akkommodation erfolgt nach einer 30-minütigen Bestrahlung mit UV-B die Synthese der maximalen Pigmentmenge. Während jedoch bei 24 Stunden lang akkommodierten Proben nach einer 60 min. andauernden Bestrahlung noch 40% der maximal gebildeten Carotinoidmenge synthetisiert werden, werden bei 2 Stunden lang akkommodierten Proben nur noch geringe Pigmentmengen gebildet.

Die Resultate der Atmungsmessung (Abb.26) sofort nach Ende der UV-B-Bestrahlung zeigen, daß auch beim Wildstamm eine Verlängerung der Akkommodationsdauer zu einer erhöhten Toleranz gegenüber UV-B führt. Nach einer 24-stündigen Dunkelphase im Anschluß an die UV-B-Bestrahlung zeigen jedoch im Gegensatz zur Mutante rd-1 diese erhöhte Toleranz nur bis zu einer Bestrahlungszeit von 60 min.

Die Ergebnisse mit dem Wildstamm zeigen, daß auch bei diesem während der Akkommodation Prozesse ablaufen, welche zu einer gesteigerten Toleranz gegenüber Strahlung führen. Im Vergleich zur Mutante rd-1 ist der schützende Einfluß der Akkommodation beim Wildstamm weniger ausgeprägt. Möglicherweise ist dieser Unterschied auf die von Mutante rd-1 während der Akkommodation

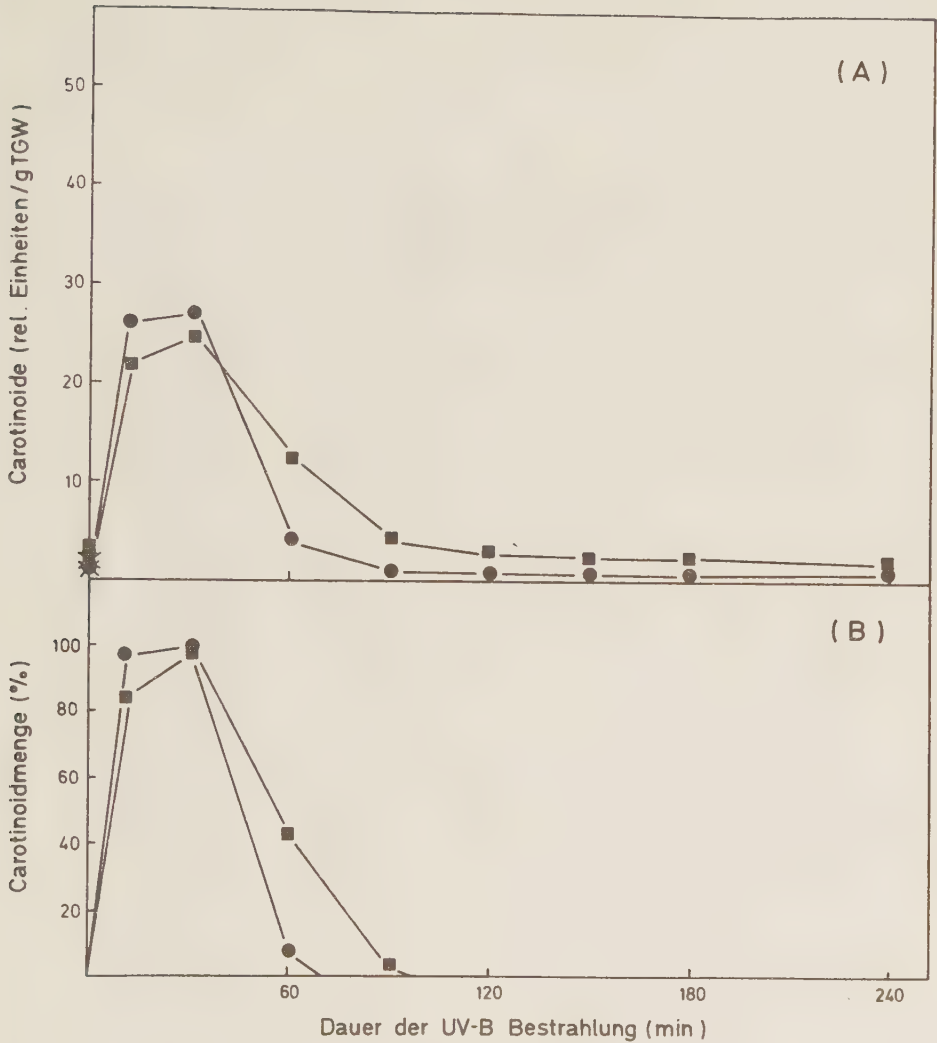


Abb. 25:

Dosis-Effekt-Kurven der Carotinoidsynthese durch Bestrahlung mit UV-B von 2h (●) lang und 24h (■) lang akkommodierten Proben des Wildstammes. (Mittelwerte aus 3 Versuchen). Dargestellt sind die Gesamtmengen an Carotinoiden in µg/TGW (A) und die durch die UV-B-Bestrahlung zusätzlich synthetisierten Carotinoidmengen in Prozent des jeweiligen Maximalwertes (B). Zusätzlich dargestellt ist der Carotinoidgehalt der Proben zu Beginn der UV-B-Bestrahlung (Sternsymbole).

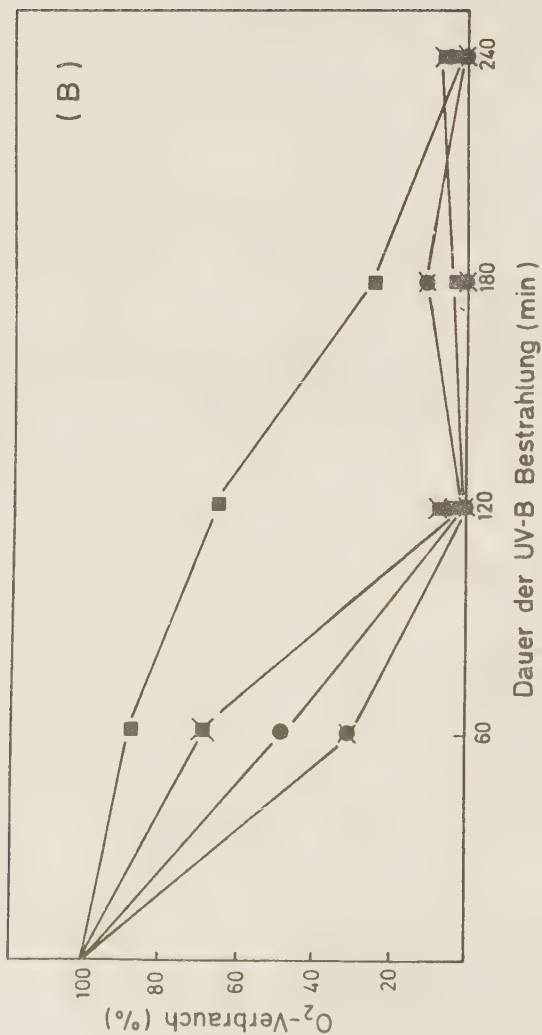


Abb. 26:

Sauerstoffverbrauch in Abhängigkeit von der Dauer der UV-B-Bestrahlung in Prozent der jeweiligen Dunkelkontrolle von 2h (●, ✕) lang und 24h (■, ■) lang akkommodierten Proben des Wildstammes gemessen sofort (●, ■) und 24h (■, ✕) nach Ende der jeweiligen UV-B-Bestrahlung. (Mittelwerte aus 3 Versuchen).

gebildeten Carotinoide zurückzuführen.

2.3.3. Die Mutante car "m1009"

Um den Einfluß der Akkommodation auf die UV-B-Empfindlichkeit unabhängig von den Carotinoiden zu untersuchen, wurden - analog zu den eben beschriebenen Versuchen an Mutante rd-1 und dem Wildstamm - Proben der Mutante car "m1009", welche im Dunkeln keine Carotinoide synthetisiert (Tab.1), 2 bzw. 24 Stunden lang im Dunkeln inkubiert (Tab.1) und anschließend mit UV-B bestrahlt. Die Carotinoidbestimmung und die Atmungsmessung erfolgten zu den unter IV.2.3.1. angegebenen Zeiten. Wie aus Abb.27 ersichtlich ist, wird die Atmung der Mutante car "m1009" bei längerer Dauer der Akkommodation weniger durch UV-B herabgesetzt. Die Atmungsrate der nur 2 Stunden lang akkommodierten Proben wird schon durch eine 60-minütige Bestrahlung mit UV-B reduziert, längere Bestrahlungszeiten führen zu einer weiteren Abnahme der Atmung. Im Laufe der sich anschließenden 24-stündigen Inkubation im Dunkeln nimmt die Atmungsrate der 60 min. und 120 min. lang bestrahlten Proben noch weiter ab.

24 Stunden lang akkommodierte Proben weisen hingegen bis zu ca. 120-minütiger Bestrahlung keine Reduktion der Atmung auf. Längere Bestrahlung führt zu einem Absinken der Atmungsaktivität: die Atmungsrate der am längsten bestrahlten Probe beträgt noch ca. 40% der Kontrollatmung. Während der nachfolgenden 24-stündigen Dunkelphase nimmt die Atmung aller Proben ab, mit Ausnahme der nur 60 min. lang bestrahlten.

Aus den Messungen zur Carotinoidsynthesefähigkeit (Abb.28) geht hervor, daß durch relativ kurze Bestrahlungszeiten die Synthese von Phytoen induziert wird. Eine 30-minütige Bestrahlung führt unabhängig von der Akkommodationsdauer zur Bildung der größten Menge an Phytoen; eine länger andauernde Bestrahlung bewirkt eine drastische Reduzierung der synthetisierten Phytoenmenge. Im Gegensatz zu den 2 Stunden lang akkommodierten Proben bei denen eine Bildung von Phytoen durch eine Bestrahlung bis zu ca. 60 min. erfolgt, ist dies bei

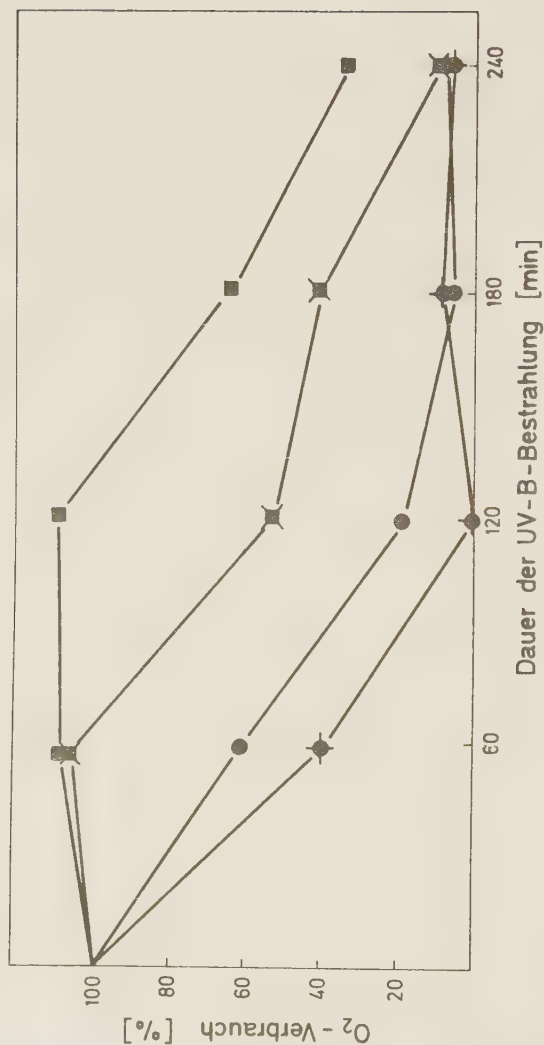


Abb. 27:

Sauerstoffverbrauch in Abhängigkeit von der Dauer der UV-B-Bestrahlung in Prozent der jeweiligen Dunkelkontrolle von 2h (●, ✱) lang und 24h (■, ✱) lang akkommodierten Proben der Mutante car "m1009" gemessen sofort (●, ■) und 24h (✱, ✱) nach Ende der jeweiligen UV-B-Bestrahlung. (Mittelwerte aus 2 Versuchen).

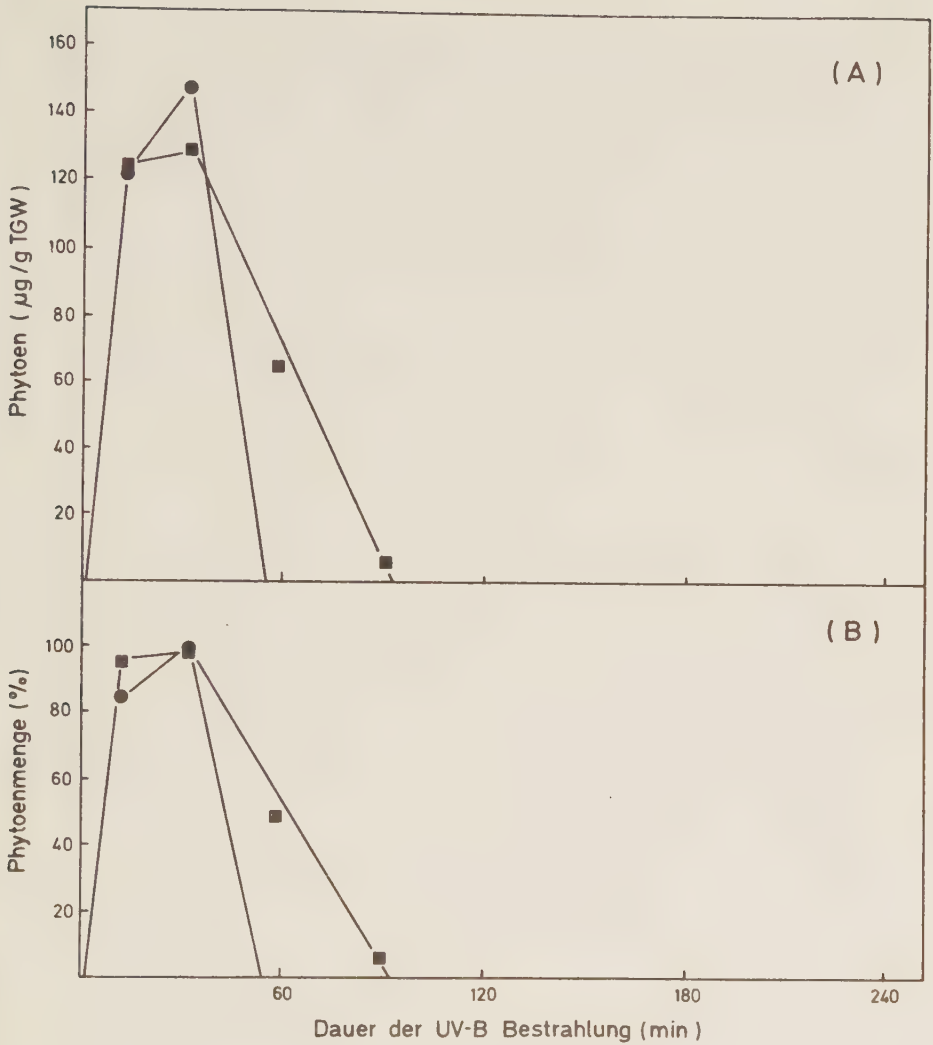


Abb. 28:

Dosis-Effekt-Kurven der Carotinoidsynthese durch Bestrahlung mit UV-B von 2h (●) lang und 24h (■) lang akkommodierten Proben der Mutante *car* "m1009". (Mittelwerte aus 3 Versuchen). Dargestellt sind die Gesamtmengen an Phytoen in µg/TGW (A) und die durch die UV-B-Bestrahlung zusätzlich synthetisierten Phytoenmengen in Prozent des jeweiligen Maximalwertes (B).

24 Stunden lang akkommodierten Proben bis zu einer Bestrahlungsdauer von ca. 90 min. möglich.

Ein Vergleich zeigt (Abb.12 und 13), daß die 2 Stunden lang akkommodierten Proben der Mutante car "m1009" dieselbe Sensitivität gegenüber UV-B besitzen wie der Wildstamm und Mutante rd-1. Eine 24-stündige Akkommodation führt auf der Ebene der Atmung bei Mutante car "m1009" zu einer höheren Toleranz gegenüber kurzweilliger Strahlung als beim Wildstamm, etwa vergleichbar mit der der Mutante rd-1, obwohl die Mutante car "m1009" nur äußerst geringe Mengen an Carotinoiden im Dunkeln synthetisiert.

2.4. Phototoxische Wirkung von UV-B-Strahlung auf Aufnahme und Einbau von radioaktiv markiertem L-Methionin in Abhängigkeit von der Akkommodationsdauer

Wie in der Einleitung dargestellt wurde, ist von *E. coli* bekannt, daß Zellen, die verzögertes Wachstum aufweisen ("growth delay") weniger durch Strahlung geschädigt werden. Aus den im vorigen Kapitel geschilderten Versuchen geht hervor, daß der Aufenthalt in Minimalmedium (Akkommodation) auch bei *Fusarium aqueductuum*, und zwar sowohl beim Wildstamm, als auch bei den Mutanten *rd-1* und *car "m1009"*, gravierend die durch UV-B-Strahlung ausgelöste Schädigung beeinflusst. Um Aussagen über den Angriffspunkt der phototoxischen Wirkung machen zu können und zur Aufklärung der intrazellulären Vorgänge, die durch die toxische Wirkung von UV-B-Strahlung ausgelöst werden, lag es nahe, die Proteinsynthese des Myzels während und nach schädigender Bestrahlung mit UV-B zu messen und zu untersuchen in welchem Umfang auch dabei die Dauer der Akkommodation die Reaktion des Pilzes auf UV-B-Strahlung beeinflussen kann. Als Maß für die Proteinsynthese wurde der Einbau von radioaktiv markiertem L-Methionin in zelleigenes, durch TCA-Behandlung fällbares Protein verwendet. Um den spezifischen Einfluß von Licht auf die Proteinsynthese erfassen zu können, war es darüberhinaus nötig, die Wirkung des Lichtes auch auf die Aufnahme des angebotenen Substrates L-Methionin zu untersuchen (Kapitel III. 1.); dies ist eine Grundvoraussetzung, um Aussagen über den primären Ort der Schädigung machen zu können.

Die Untersuchungen wurden an der Mutante *car "m1009"* durchgeführt, welche im Dunkeln nahezu keine Carotinoide bildet; so war es möglich den Einfluß der Akkommodationsdauer ohne die gleichzeitige Wirkung im Dunkeln synthetisierter Carotinoide zu erfassen.

Proben der Mutante *car "m1009"* wurden 2 bzw. 24 Stunden lang im Dunkeln inkubiert (akkommodiert). Jeweils eine Stunde vor Ende der Akkommodation wurde nicht radioaktiv markiertes L-Methionin zugegeben (siehe Kapitel III. 1), was ein unspe-

zifisches überschießen der Aufnahme von markiertem Methionin als Folge zu lang andauernden Methioninmangels im Medium während der Messungen verhindern sollte (Huber-Willer, 1982). Nach Ende der Akkommodation erfolgte die Zugabe von radioaktiv markiertem L-Methionin und eine 4-stündige Bestrahlung mit UV-B (400mW/m^2 bzw. 60mW/m^2). Ein Teil der Proben verblieb zur Kontrolle während der gesamten Versuchsdauer im Dunkeln. Zu verschiedenen Zeiten während und nach der Bestrahlung wurden Aliquots entnommen, um die Menge an aufgenommenem und eingebautem Methionin zu bestimmen (siehe Kapitel III. 1.). Abb.29 (A) zeigt den Verlauf der Aufnahme und des Einbaus von radioaktivem Methionin während und nach der Bestrahlung mit UV-B einer Intensität von 400mW/m^2 bzw. während der entsprechenden Inkubation im Dunkeln bei 2 Stunden akkommodierten Proben.

Im Dunkeln wird Methionin über einen Zeitraum von ca. 90 min. schnell, dann jedoch langsamer ins Myzel aufgenommen und in Protein eingebaut. Durch Bestimmung des im Inkubationsmedium vorhandenen Methionins konnte gezeigt werden, daß zu jedem Zeitpunkt des Versuchs noch eine große Menge des angebotenen Methionins im Medium vorlag, sodaß eine Limitierung der Methioninaufnahme durch mangelndes Substratangebot nicht gegeben war; 30 Stunden nach Zugabe des radioaktiven L-Methionins lagen noch ca. 85% an Methionin im Medium vor. Die Bestrahlung mit UV-B führt zu einer starken Hemmung von Aufnahme und Einbau von Methionin schon während der ersten 30 min.; zu dieser Zeit beträgt die aufgenommene Methioninmenge nur ca. 22% und die eingebaute Methioninmenge nur ca. 25% von jener der entsprechenden Dunkelkontrolle. Längere Bestrahlungszeiten führen zu einer vollständigen Hemmung des Einbaus und zur Abnahme von Radioaktivität im Myzel bis auf das Niveau, das dem des eingebauten Methionins entspricht. Dies weist auf einen Efflux von radioaktiv markiertem, nicht eingebautem Methionin hin. Da nach 30 min. noch ein Überschuß an nicht eingebautem Methionin im Myzel vorliegt, kann der Einbau also nicht durch eine Hemmung von Transportvorgängen, die

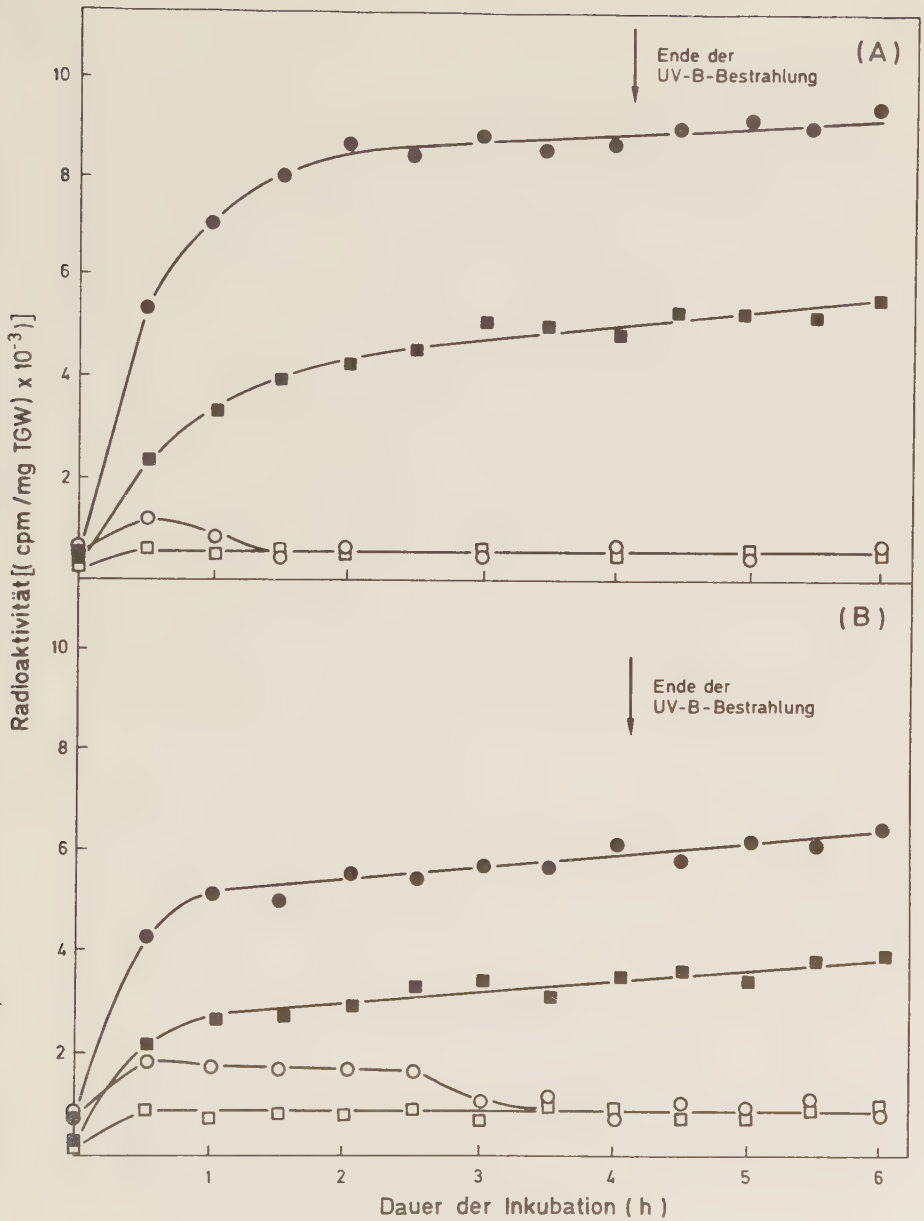


Abb. 29:

Verlauf der Aufnahme (●, ○) und des Einbaues (■, □) von radioaktiv markiertem L-Methionin während und nach einer 4-stündigen Bestrahlung mit UV-B einer Intensität von 400mW/m² (offene Symbole) bzw. im Dunkeln (geschlossene Symbole) bei 2h (A) lang und 24h (B) lang akkommodierten Proben der Mutante *car* "m1009". (Mittelwerte aus 2 Versuchen).

Zelle zum Erliegen kommen.

In Abb.29 (B) sind die entsprechenden Daten für 24 Stunden lang akkommodiertes Myzel dargestellt. Sie zeigen, daß solches Myzel weniger Methionin aufnimmt als 2 Stunden lang akkommodiertes, was eventuell auf seine geringere Stoffwechselaktivität als Folge der relativ langen Inkubation unter Minimalbedingungen zurückzuführen ist.

Die Aufnahme und der Einbau von L-Methionin erfolgen bis zu ca. 60 min. rasch, dann jedoch weiter mit drastisch verringerter Rate. Eine Limitierung der Aufnahme von Methionin durch eine zu geringe Substratkonzentration im Medium konnte auch hier wieder ausgeschlossen werden; am Ende des Versuchs lagen noch ca. 85% des angebotenen Methionins im Medium vor.

Durch Einstrahlung von UV-B werden Aufnahme und Einbau sehr rasch gehemmt und kommen wie bei den 2 Stunden lang akkommodierten Proben schon nach 30 Minuten der Bestrahlung zum Stillstand. Ungefähr 43% des von der Dunkelkontrolle nach 30-minütiger Inkubation aufgenommenen Methionins werden unter Einwirkung von UV-B aufgenommen (bei den 2 Stunden lang akkommodierten Proben waren es nur ca. 22%) und 40% des entsprechenden Kontrollwertes in Protein eingebaut (bei 2 Stunden lang akkommodierten Proben waren es nur ca. 25%). Auch bei den 24 Stunden lang akkommodierten Proben kommt es zu einem Efflux des gesamten nicht in Protein eingebauten Methionins, bis auf das Niveau, das dem des eingebauten Methionins entspricht. Im Gegensatz zu dem nur 2 Stunden lang akkommodierten Myzel, bei dem der Efflux schon ca. 90 min. nach Beginn der Bestrahlung beendet ist, nimmt bei 24 Stunden lang akkommodiertem Myzel die Menge an radioaktivem Methionin während der ersten 30-180 min. der UV-B-Bestrahlung ab.

Aus Abb.29 (B) wird deutlich, daß wie bei den 24 Stunden lang akkommodierten Proben, der Einbau von Methionin in Protein schon dann zum Stillstand kommt, wenn noch genügend freies Methionin im Myzel zur Verfügung steht. Folglich kann auch hier ausgeschlossen werden, daß die Hemmung der Proteinsynthese eine Folge der Hemmung spezifischer Transportsysteme ist.

Die Ergebnisse zeigen also deutlich, daß eine Bestrahlungsstärke von 400mW/m^2 sehr schnell und sehr drastisch die Aufnahme und den Einbau von Methionin schädigt, unabhängig von der Akkommodationsdauer, welche lediglich auf das Ausmaß der jeweiligen Hemmung Einfluß nimmt. Bei Bestrahlung mit einer geringeren Intensität kommt es zu einer weniger massiven Schädigung des Myzels. Versuche am Wildstamm (Rau et al., im Druck) zeigten, daß eine Intensität von 60mW/m^2 eine deutlich geringere Schädigung verursacht. Wie aus den Abbildungen 11 und 12 hervorgeht, unterscheiden sich Wildstamm und Mutante car "m1009" nicht in ihrer Empfindlichkeit gegenüber UV-B-Strahlung. In Analogie zu dem oben beschriebenen Versuch wurden deshalb unterschiedlich lang akkommodierte Proben der Mutante car "m1009" mit UV-B einer Intensität von 60mW/m^2 bestrahlt. In Abb.30 sind die dabei gewonnenen Ergebnisse dargestellt.

Die geringere Bestrahlungsstärke führt bei 2-stündiger Akkommodation ebenfalls zu einer schnellen Reduzierung von Aufnahme und Einbau von Methionin, allerdings in einem viel geringeren Maße als 400mW/m^2 ; die Aufnahme von Methionin kommt bei der gewählten Bestrahlungsstärke nicht zum Stillstand. Ab einer Inkubationsdauer von ca. 120 min. scheint die Aufnahme in bestrahlten und nicht bestrahlten Proben sogar parallel zu verlaufen; UV-B-Strahlung scheint also keinen weitergehenden Einfluß mehr zu haben. Der Einbau von Methionin wird im Gegensatz zur höheren Intensität erst ab einer Bestrahlungsdauer von ca. 60-90 min. vollständig gehemmt. Unter dem Einfluß von UV-B geht der Anteil des eingebauten Methionins am gesamten im Myzel vorhandenen Methionin zurück: während dieser Anteil bei 4 Stunden im Dunkeln inkubierten Proben ca. 57% beträgt, beträgt er bei 4 Stunden lang bestrahlten Proben nur ca. 26%. Bei 24 Stunden lang akkommodierten Proben wird die Aufnahme von Methionin während der Bestrahlung mit UV-B dieser Beleuchtungsstärke im Gegensatz zu den nur 2 Stunden lang akkommodierten Proben nicht wesentlich beeinträchtigt. Eine anfängliche geringfügige Reduzierung der Methioninaufnahme bei UV-bestrahlten Proben scheint mit zunehmender Versuchsdauer

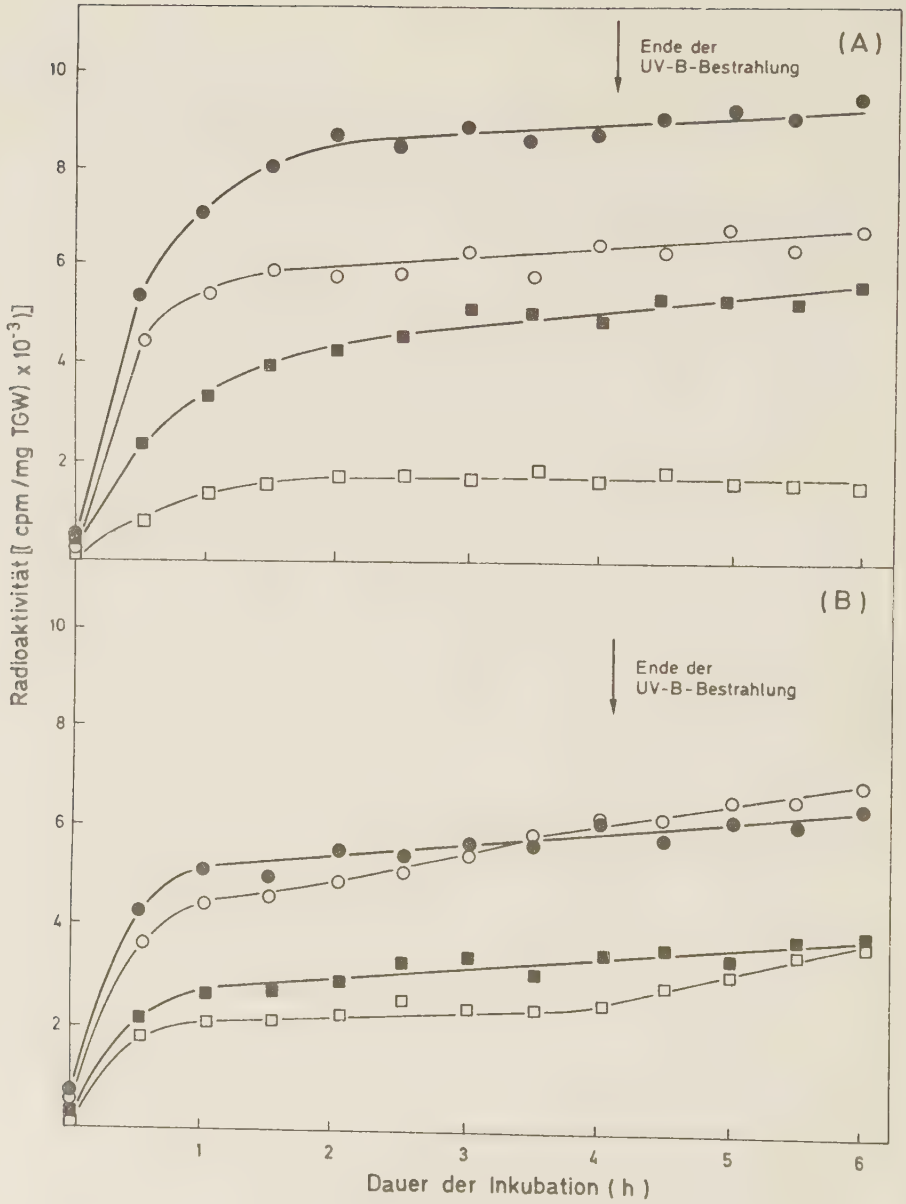


Abb. 30:

Verlauf der Aufnahme (●, ○) und des Einbaues (■, □) von radioaktiv markiertem L-Methionin während und nach einer 4-stündigen Bestrahlung mit UV-B einer Intensität von 60mW/m^2 (offene Symbole) bzw. im Dunkeln (geschlossene Symbole) bei 2h (A) lang und 24h (B) lang akkommodierten Proben der Mutante *car* "m1009". (Mittelwerte aus 2 Versuchen).

und vor allem nach Ende der Bestrahlung kompensiert zu werden, so daß sogar eine geringfügige Erhöhung der Methioninaufnahme gemessen wurde.

Der Einbau von Methionin kommt bei den bestrahlten Proben nach ca. 60 min. zum Stillstand, läuft allerdings nach Beendigung der Bestrahlung sofort weiter. Ähnlich wie bei den 2 Stunden lang akkommodierten Proben kommt es unter dem Einfluß von UV-Licht zu einer Verminderung des Anteils des eingebauten Methionins am gesamten in der Zelle vorhandenen Methionin. Ein deutlicher Einfluß der Akkommodationsdauer auf die Schädigung der Methionin-Aufnahmefähigkeit und der Proteinsynthese durch UV-B-Strahlung konnte also bei der geringeren Bestrahlungsstärke viel deutlicher nachgewiesen werden.

2.5. "Regenerationsvermögen" des Pilzes nach schädigender Bestrahlung mit UV-B

Die bisher geschilderten Ergebnisse zeigen, daß es bei *Fusarium aquaeductuum* Mechanismen gibt, die zu einer gesteigerten Toleranz gegenüber UV-B-Strahlung führen. Neben der Frage nach eventuellen Schutzmechanismen ist jedoch auch die Frage nach der "Regenerationsfähigkeit" von Schäden, welche sich bereits manifestiert haben, von großem Interesse. In der Literatur werden neben der Photoreaktivierung Regenerationsphänomene beschrieben, bei denen in erster Linie die Reparatur geschädigter DNA von Bedeutung ist: Tang und Patrick (1977) beschreiben eine "liquid holding recovery" bei durch Strahlung geschädigten Zellen von *E. coli*; bei *uvr*-Mutanten von *E. coli* konnte eine "minimal medium recovery" nachgewiesen werden (Jagger, 1985). Kelland et al. (1983) dagegen konnten eine Regeneration bei durch UV-A-Strahlung geschädigten Zellen von *E. coli*, die in einem Komplexmedium inkubiert wurden, nachweisen, bei der die Synthese von Membranen eine entscheidende Rolle spielt. Untersuchungen von Huber-Willer (1982) und Schrott (1985) lassen darauf schließen, daß auch bei *Fusarium aquaeductuum* ein "Regenerationsvermögen" existiert; es wird

z.B. die Regeneration der Carotinoidsynthesefähigkeit nach schädigender Bestrahlung mit UV-A diskutiert. Weiter konnte gezeigt werden, daß sich mit Blaulicht vorbehandeltes Myzel von *Fusarium* schneller erholt. Auch die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse, wonach die Carotinoidsynthese nach Bestrahlung mit UV-B erst nach 48 Stunden abgeschlossen ist, die durch Blaulicht induzierte Carotinoidsynthese jedoch schon nach 24 Stunden, könnten als Hinweis auf eine Regenerationsfähigkeit des Myzels interpretiert werden. Es wurde deshalb zusätzlich untersucht, ob eine Regeneration der Methioninaufnahmefähigkeit und der Proteinsynthese, die durch UV-B-Strahlung geschädigt werden (siehe Abschnitt IV.2.3.), eintritt. Die entsprechenden Versuche wurden im Rahmen der in Abschnitt IV.2.3. geschilderten Untersuchungen durchgeführt (Versuchsdurchführung siehe deshalb Kapitel IV.2.3.).

Die Ergebnisse sind in den Abb.31 und 32 dargestellt und zeigen, daß die durch eine Bestrahlung mit UV-B der Intensität 400mW/m^2 bewirkte Hemmung der Methioninaufnahme und des Methionineinbaus (vgl. Abb.29) unabhängig von der Dauer der Akkommodation auch nach dem Ende der UV-B-Bestrahlung anhält. Eine Regeneration tritt selbst in einem Zeitraum von 26 Stunden nach Ende der Bestrahlung nicht ein. Eine Bestrahlungsstärke von 60mW/m^2 führt dagegen zu einer vergleichsweise geringeren Hemmung von Methioninaufnahme und -einbau (vgl. Abb.30) (Ausnahme: 24 Stunden lang akkommodierte Proben, deren Methioninaufnahme nicht wesentlich beeinflusst wird), obwohl die Proteinsynthese unabhängig von der Akkommodationsdauer mit zunehmender Dauer der Bestrahlung ebenfalls vollständig gehemmt wird. Bei den 24 Stunden lang akkommodierten Proben setzt aber sofort nach der Bestrahlung der Einbau von radioaktiv markiertem L-Methionin wieder ein. Im Laufe der sich an die Bestrahlung anschließenden 26-stündigen Inkubation im Dunkeln erfolgt eine vollständige Regeneration; die gemessenen Schäden werden kompensiert, so daß am Ende die Mengen an aufgenommenem und eingebautem radioaktiv markiertem Methionin in den UV-B-bestrahlten und den nicht UV-B-bestrahlten Proben gleich sind.

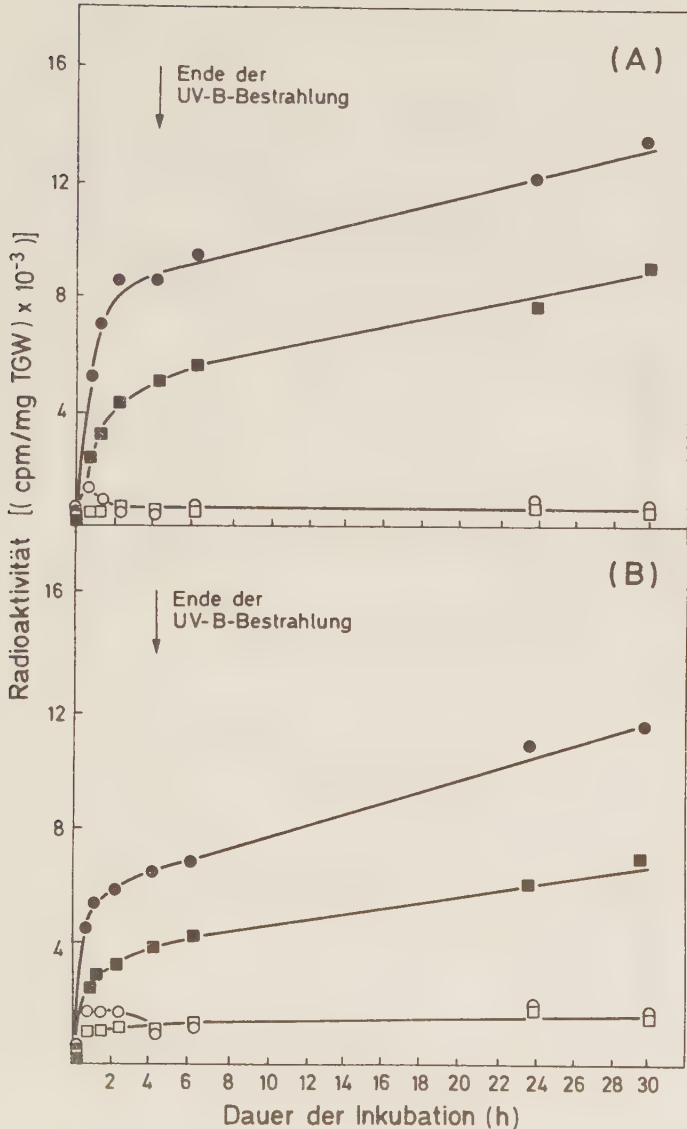


Abb. 31:

Verlauf der Aufnahme (●, ○) und des Einbaues (■, □) von radioaktiv markiertem L-Methionin während und nach einer 4-stündigen Bestrahlung mit UV-B einer Intensität von 400mW/m² (offene Symbole) bzw. im Dunkeln (geschlossene Symbole) bei 2h (A) und 24h (B) lang akkommodierten Proben der Mutante *car* "m1009". (Mittelwerte aus 2 Versuchen).

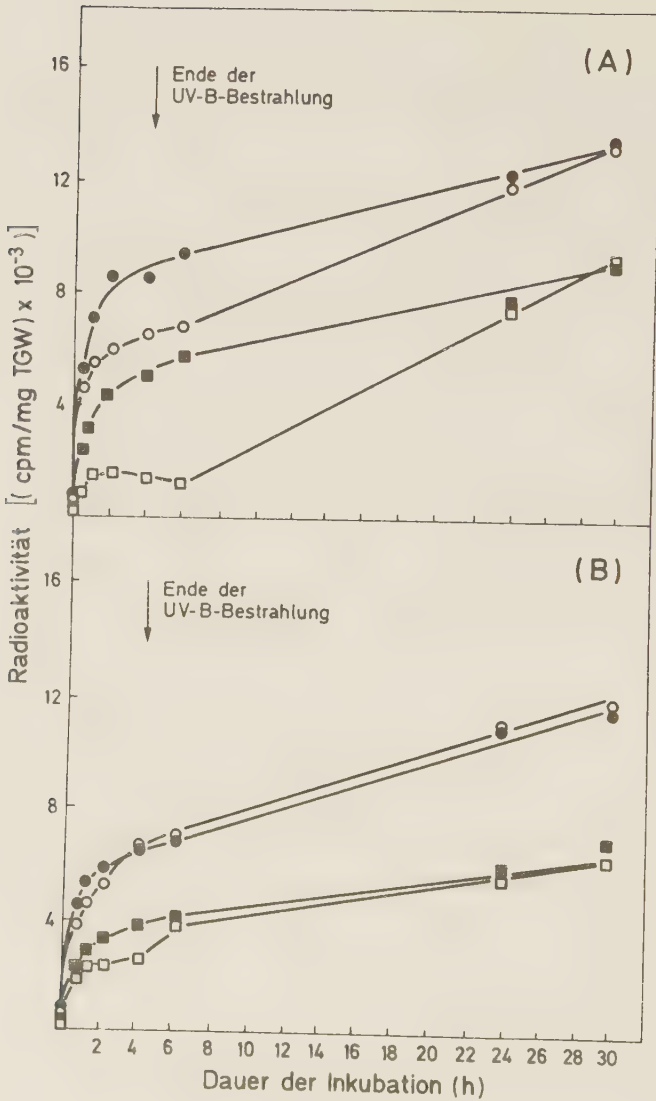


Abb. 32:

Verlauf der Aufnahme (●, ○) und des Einbaues (■, □) von radioaktiv markiertem L-Methionin während und nach einer 4-stündigen Bestrahlung mit UV-B einer Intensität von 60mW/m² (offene Symbole) bzw. im Dunkeln (geschlossene Symbole) bei 2h (A) und 24h (B) lang akkommodierten Proben der Mutante car "m1009". (Mittelwerte aus 2 Versuchen).

Ein Vergleich der Ergebnisse zeigt, daß nur bei der Intensität, bei der kein Efflux an freiem Methionin aus dem Myzel gemessen wurde, also offenbar keine Schädigung der Membran als Diffusionsbarriere vorlag, eine Regeneration möglich ist. Daraus könnte auf einen möglichen Zusammenhang von Integrität der Membran und der Fähigkeit zur Regeneration geschlossen werden.

3. Lipidanalyse belichteter und unbelichteter Proben von Wildstamm und Mutanten

Aus den Ergebnissen, die in Kapitel IV.2. geschildert wurden, wird deutlich, daß neben den Carotinoiden auch noch andere Faktoren die UV-B-Empfindlichkeit von *Fusarium aquaeductuum* beeinflussen. Membranen gelten als ein wichtiger Angriffspunkt photodynamischer Schädigung (Hollaender, 1943; Moss und Smith, 1981; Huber-Willer, 1982; Kelland et al., 1983; Ito et Ito, 1983). Da sowohl Phospholipide, als auch Sterine Grundsubstanz biologischer Membranen sind, beide Komponenten im UV-Bereich absorbieren und die Lipidzusammensetzung die Fluidität der Membran mitbestimmt (Lit. siehe Stryer, 1981), wäre es denkbar, daß beide Komponenten das Ausmaß der Schädigung durch kurzwellige Strahlung beeinflussen. Unterschiede in der Empfindlichkeit verschiedener Organismen gegenüber UV-Strahlung konnten u. a. Folge unterschiedlichen Lipidgehaltes und unterschiedlicher Lipidzusammensetzung sein. Aus diesem Grund wurde ein Vergleich zwischen Wildstamm und Mutanten auf der Ebene der Lipide vorgenommen. Es sollte weiter untersucht werden, ob eine Bestrahlung mit Blaulicht und eine verlängerte Akkommodationsdauer zu Veränderungen der Lipide führt. Dies könnte letztlich zu der geringeren Sensitivität blau belichteten bzw. länger akkommodierten Myzels gegenüber UV-B-Strahlung beitragen (Kapitel IV. 2.).

3.1. Phospholipidzusammensetzung bei Wildstamm und Mutanten

Möglicherweise beeinflusst die Phospholipidzusammensetzung das Ausmaß der Schädigung biologischer Membranen durch UV-B. Miki et al. (1987) fanden bei roten Blutkörperchen eine verglichen mit anderen Phospholipiden verstärkte Peroxidation von Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin und Arachidonsäuren in Anwesenheit freier Radikale.

Zur Bestimmung der Phospholipidzusammensetzung belichteter und unbelichteter Proben des Wildstammes und der Mutanten wurden die Lipide entweder sofort nach Beendigung der Anzucht aus dem

Myzel extrahiert oder erst nach einer 24-stündigen Inkubation in Minimalmedium. Ein Teil der 24 Stunden inkubierten Proben wurde 2 Stunden nach Ernte des Myzels 30 Minuten lang mit Blaulicht belichtet. Der gewonnene Lipidextrakt wurde ein-dimensional über Dunnschichtchromatographie aufgetrennt. In Abbildung 33 ist das nach Anfärbung mit Jod erhaltene Lipidmuster exemplarisch für den Wildstamm graphisch dargestellt.

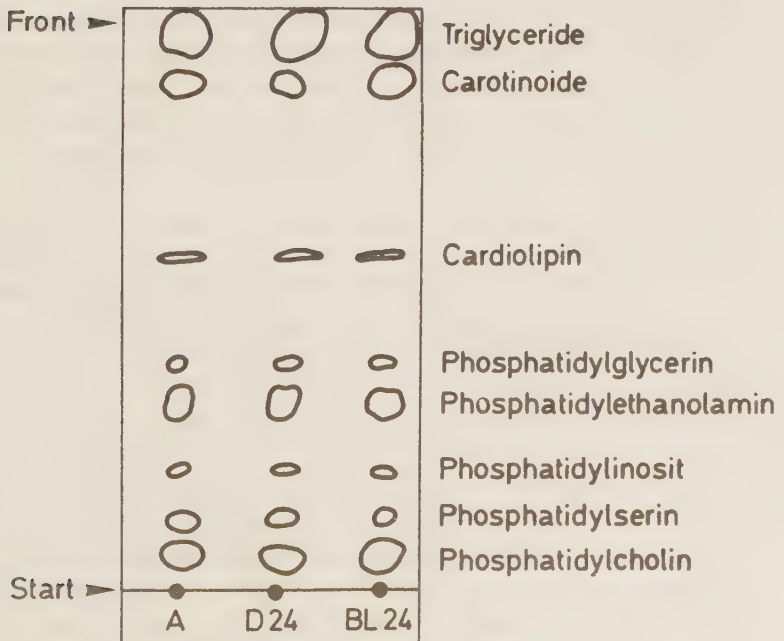
Abb. 33:

Dunnschichtchromatographische Auftrennung von Lipidextrakten aus dem Wildstamm.

A: sofort nach Beendigung der Anzucht;

D24: nach 24h Inkubation im Dunkeln;

L24: nach 2h Inkubation im Dunkeln, 30 minütiger Belichtung und anschließender 21.5h dauernder Inkubation im Dunkeln.



Triglyceride und Carotinoide wandern in dem gewählten Chromatographiesystem sehr schnell und werden nicht in einzelne Komponenten aufgetrennt. Eine Identifizierung der verschiedenen Phospholipide war dagegen gut möglich. Qualitativ und quantitativ ergaben sich keine großen Unterschiede zwischen Wildstamm und Mutanten. Sowohl während der Inkubation im Dunkeln, als auch nach Bestrahlung mit Blaulicht zeigten sich ebenfalls keine Änderungen im Phospholipidmuster:

Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin treten als Hauptkomponenten auf; daneben sind noch Phosphatidylinosit, Phosphatidylglycerin und Cardiolipin nachweisbar.

3.2. Fettsäurezusammensetzung der Membranfraktion des Wildstammes

Aus Untersuchungen von Klamen und Tuveson (1982) geht hervor, daß das Verhältnis gesättigter zu ungesättigten Fettsäuren in den Phospholipiden die Sensitivität eines Organismus gegenüber UV-B-Strahlung beeinflussen kann. Wie bekannt ist, kann 1O_2 , welcher durch Bestrahlung entstehen kann, mit den Doppelbindungen ungesättigter Fettsäuren reagieren und eine Peroxidation der Lipide bewirken.

Es sollte nun exemplarisch am Wildstamm untersucht werden, ob während der Akkommodation des Pilzes bzw. nach einer Behandlung mit Blaulicht Veränderungen in der Fettsäurezusammensetzung auftreten. Dazu wurden Proben des Wildstammes 6.5 Stunden inkubiert, ein Teil davon nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden 30 min. lang mit Blaulicht bestrahlt. Ein weiterer Teil der Proben wurde 24 Stunden ausschließlich im Dunkeln gehalten. Zusätzlich sollte gezeigt werden, welchen Einfluß eine Bestrahlung mit UV-B auf den Saturierungsgrad der Fettsäuren hat. Dazu wurde ein Teil der Proben nach einer Gesamtinkubationszeit von 6.5 Stunden 4 Stunden lang mit UV-B (400 mW/m^2) bestrahlt.

Nach Beendigung der jeweiligen Inkubation wurde die Membranfraktion aus den Proben gewonnen und daraus die Lipide extra-

hiert. Die durch Umesterung aus den Phospholipiden freigesetzten, nach Umesterung als Methylester vorliegenden Fettsäuren wurden durch Gaschromatographie aufgetrennt und identifiziert. Die prozentuale Zusammensetzung der Fettsäuregemische der unterschiedlich behandelten Proben ist Tabelle 3 zu entnehmen. Ein Vergleich von 6.5 und 24 Stunden im Dunkeln gehaltener Proben zeigt, daß sich der prozentuale Anteil der zweifach ungesättigten Linolsäure (C18:2) während der Dunkelinkubation verringert, die restlichen Fettsäuren dagegen mehr oder weniger unverändert bleiben. Der Anteil "sonstiger" Fettsäuren nimmt dagegen zu. Eine 30-minütige Bestrahlung mit blauem Licht führt während der untersuchten Zeitspanne zu keinen deutlichen Unterschieden in der Fettsäurekomposition. Eine 4-stündige Bestrahlung mit UV-B führt zu einer Reduktion des Anteils der Linolsäure, während sich der Anteil der ungesättigten Palmitinsäure (C16:0) und eventuell auch der gesättigten Stearinsäure (C18:0) vergrößert. Aus den Ergebnissen geht deutlich hervor, daß unter dem Einfluß von UV-B-Strahlung möglicherweise bedingt durch Oxidation der Doppelbindungen der Fettsäuren, der Anteil der ungesättigten Fettsäuren zurückgeht und dementsprechend der Anteil der gesättigten zunimmt.

Tabelle 3:

Prozentuale Fettsäurezusammensetzung belichteter und unbelichteter Proben des Wildstammes.

D6.5/D24: nach 6.5- bzw. 24-stündiger Inkubation im Dunkeln;
D/UV: nach 6.5-stündiger Inkubation im Dunkeln und anschließender 4-stündiger UV-B-Bestrahlung (400mW/m²);
L6.5: nach 2-stündiger Inkubation im Dunkeln, 30-minütiger Belichtung mit Blaulicht und weiterer 4-stündiger Inkubation im Dunkeln;
L/UV: wie L6.5 und anschließender 4-stündiger UV-B-Bestrahlung (400mW/m²);
C16:0 = Palmitinsäure; C18:0 = Stearinsäure; C18:1 = Ölsäure;
C18:2 = Linolsäure; C18:3 = Linolensäure;
unges. FS = ungesättigte Fettsäuren;
ges. FS = gesättigte Fettsäuren.

Tabelle 3:

	D6.5	L6.5	D24	D/UV	L/UV
C16:0	22.0	19.4	20.2	28.9	26.8
C18:0	10.1	9.3	9.3	12.6	15.0
C18:1	25.3	24.2	26.8	26.1	25.0
C18:2	34.0	36.6	28.6	25.1	27.0
C18:3	1.5	1.0	1.5	1.0	1.0
"Sonstige"	7.5	9.5	13.6	6.1	5.2
Σ d.unges.FS	60.8	61.8	56.9	52.2	53.0
Σ d.ges.FS	32.1	28.7	29.5	41.7	41.8

3.3. Steringehalt belichteter und unbelichteter Proben des Wildstammes und der Mutanten

Das Myzel des Pilzes *Fusarium aquaeductuum* enthält große Mengen an Sterinen, deren Hauptkomponente von Lang (1969) als Ergosterin beschrieben wurde. Da die Sterine im UV-Bereich eine starke Absorption aufweisen und sie die Fluidität der Membran mitbestimmen (Lit. siehe Stryer, 1981), ist es denkbar, daß sie die Empfindlichkeit des Pilzes gegenüber kurzweiliger Strahlung beeinflussen. Deshalb wurden belichtete und unbelichtete Proben des Wildstammes und der Mutanten bezüglich ihres Steringehaltes untersucht. Die Lipide wurden entweder sofort nach Beendigung der Anzucht oder nach anschließender 24-stündiger Inkubation im Dunkeln unter "step-down"-Bedingungen aus dem Myzel von Wildstamm und Mutanten extrahiert. Ein Teil der Proben wurde nach 2-stündiger Akkommodation im Dunkeln 30 Minuten lang mit Blaulicht belichtet und anschließend im Dunkeln weiterinkubiert. Die Ergebnisse sind

in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Unmittelbar nach Beendigung der Anzucht enthalten die Myzelien von Wildstamm, Mutante car "m1202" und Mutante rd-1 5.5-6.0mg Sterine pro Gramm Trockengewicht, während Mutante car "m1009" zum entsprechenden Zeitpunkt 10.2mg pro Gramm Trockengewicht enthält. Lang (1969) fand im Myzel von Wildstamm und Mutante rd-1 einen etwas höheren Steringehalt. Eine mögliche Erklärung dafür ist, daß Lang 36-40 Stunden altes Myzel verwendete, während es sich bei allen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche um Myzel handelte, das ein physiologisches Alter von 18 Stunden hatte. Bei allen Organismen führte eine 24-stündige Inkubation unter "step-down"-Bedingungen zu einer Steigerung des Steringehaltes um den Faktor 1.5. Die Sterinmengen pro Gramm Trockengewicht 30 Minuten belichteter und anschließend 24 Stunden im Dunkeln gehaltener Proben lagen beim Wildstamm und den Mutanten um ca. 5% unter denen der entsprechenden Dunkelkontrollen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Lang (1969) konnte vermutet werden, daß Licht eine geringfügige Hemmung der Sterinbiosynthese bewirkt.

Tabelle 4:

Steringehalt in mg/g TGW belichteter und unbelichteter Proben des Wildstammes und der verschiedenen Mutanten.
(Mittelwerte aus 2 Versuchen).

A: nach Beendigung der Anzucht;

D24: nach 24-stündiger Inkubation im Dunkeln;

L24: nach 2-stündiger Akkommodation, 30-minütiger Belichtung und anschließender 24-stündiger Inkubation im Dunkeln.

	A	D24	L24
Wildstamm	5.5	8.4	8.0
Mutante rd-1	5.9	9.0	8.6
Mutante car "m1202"	6.0	9.1	8.8
Mutante car "m1009"	10.2	15.2	14.6

V. Diskussion

Wie in der Einleitung dargestellt wurde, kommt es möglicherweise durch eine durch anthropogene Einflüsse ausgelöste Reduzierung der stratosphärischen Ozonschicht zu einer Zunahme der auf die Erdoberfläche auftreffenden UV-B-Strahlung und folglich zu einer erhöhten Strahlenbelastung für die Organismen auf der Erde. Bei phototrophen Organismen sind Carotinoide effektive Schutzpigmente vor Strahlung, da sie eine Photo-destruktion des Photosyntheseapparates verhindern. In der vorliegenden Arbeit wurde am Beispiel des imperfekten Wasserpilzes *Fusarium aquaeductuum* untersucht, ob Carotinoide einen Schutz auch vor UV-B-Strahlung bieten, und ob die lichtinduzierte Carotinoidsynthese eine Art der "photoprotection", wie sie von vielen Autoren beschrieben wird (Lit. siehe Jagger, 1985), darstellt und als aktive Anpassung an das Strahlungsklima interpretiert werden kann.

Dazu wurden in vergleichenden Studien durch UV-B-Strahlung ausgelöste Schäden am Wildstamm, der Regulationsmutante *rd-1* (Theimer, 1968), welche schon im Dunkeln große Mengen an Carotinoiden akkumuliert, und an den Biosynthesemutanten *car "m1202"* und *car "m1009"*, welche im Vergleich zum Wildstamm nach Lichtinduktion ein anderes Carotinoidgemisch synthetisieren, untersucht. Bei der Interpretation der Ergebnisse muß jedoch bedacht werden, daß, wie ebenfalls in der Einleitung schon erläutert wurde, eine die Carotinoidsynthese auslösende Belichtung mit Blaulicht möglicherweise noch zusätzlich andere Mechanismen auslösen könnte, welche im Sinne einer "photoprotection", oder eines "induzierbaren Reparatursystems" wirksam werden könnten (Jagger, 1985) und so einen zusätzlichen Schutz bewirken würden.

Grundvoraussetzung für diese Experimente war es, einige Charakteristika der Carotinoidsynthese bei den Mutanten aufzuklären und die gebildeten Pigmentgemische zu analysieren.

Einige Charakteristika der Photoinduktion und Carotinoidzusammensetzung

Es konnte gezeigt werden, daß analog zum Wildstamm die beiden Mutanten car "m1202" und car "m1009" im Dunkeln nur geringe Mengen an Carotinoiden synthetisieren und erst nach Lichtinduktion eine Akkumulation relativ großer Pigmentmengen stattfindet (Tab.1). Dabei stimmen sowohl der zeitliche Verlauf der Carotinoidsynthese, als auch die Form der Dosis-Effekt-Kurven weitgehend überein (Kapitel IV.1.). Da eine Induktion mit derselben Lichtdosis beim Wildstamm und den Mutanten car "m1202" und car "m1009" zur Bildung von etwa gleich großen Pigmentmengen führt, kann daraus geschlossen werden, daß der "photoresponse" (Jagger, 1985) auf eine die Carotinoidsynthese auslösende Belichtung mit Blaulicht "gleich groß" ist. Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse ist es sehr wahrscheinlich, daß beim Wildstamm und den Mutanten car "m1202" und car "m1009" Regulation, Induktion und Transduktion in derselben Weise verlaufen.

Gravierende Unterschiede bestehen dagegen in der Zusammensetzung der im Dunkeln und nach Belichtung synthetisierten Pigmentgemische ("Biosynthesemutanten") (Tab.1). Im Gegensatz zum Wildstamm, der vor allem Neurosporaxanthin, das Endprodukt der Biosynthesekette, aber auch Lycopin, γ -Carotin und Torulin bildet, akkumuliert die Mutante car "m1009" nach Belichtung hauptsächlich Phytoen; alle im Biosyntheseweg nachfolgenden Carotinoide werden nicht oder nur in Spuren gebildet. Dadurch konnte zum erstenmal eindeutig nachgewiesen werden, daß die Phytoensynthese photoreguliert ist; aus allen bisherigen Untersuchungen hätte man schließen können, daß die Akkumulation von Phytoen eventuell über ein negatives "feed-back" seine eigene Synthese hemmt und die Photoregulation der Carotinoidbiosynthese erst an einem späteren Schritt der Synthesekette ansetzt.

Bezüglich des "genetischen Blockes" könnte es sich bei der Mutante car "m1009" um eine Mutante handeln, welche den ebenfalls Phytoen-akkumulierenden carB-Mutanten des Pilzes

Phycomyces blakesleeenans (Aragon et al., 1976; Cerda-Olmedo, 1985), vergleichbar ist: eine Metabolisierung des Phytoens ist durch eine Mutation, welche wahrscheinlich die dafür notwendige Dehydrogenaseaktivität betrifft, nicht möglich.

Deutlich verschieden von Mutante *car* "m1009" ist die Mutante *car* "m1202", welche nach Lichtinduktion nicht nur Phytoen, sondern auch Phytofluen, ζ -Carotin und Neurosporin bildet; eine Dehydrierung von Phytoen ist also möglich, wenn auch wahrscheinlich in geringerem Umfang als beim Wildstamm, weil Phytoen und nicht das im Biosyntheseweg nachfolgende Neurosporin stark akkumuliert wird. Letzteres könnte jedoch auch damit erklärt werden, daß die im Vergleich zum Wildstamm verstärkte Anhäufung von ζ -Carotin und Neurosporin die Dehydrierung des Phytoens hemmt.

Nach dem Neurosporin ist die Mutante "leaky"; eine Akkumulation von Lycopin, wie bei den *carR*-Mutanten von *Phycomyces*, bei denen ähnlich wie bei der Mutante *car* "m1202" Dehydrierungsreaktionen ausgehend vom Phytoen möglich sind, findet also nicht statt. Daraus könnte geschlossen werden, daß an den Dehydrierungsschritten vom Phytoen bis zum Neurosporin möglicherweise andere Genprodukte beteiligt sind als an der Dehydrierung des Neurosporins zum Lycopin. Cerda-Olmedo (1987) nimmt dagegen an, daß bei dem Pilz *Phycomyces* nur ein Genprodukt für die Umsetzung des Phytoens zum Lycopin verantwortlich ist (Cerda-Olmedo, 1985), weil bisher nur entweder Phytoen-akkumulierende *carB*-Mutanten oder Lycopin-akkumulierende *carR*-Mutanten isoliert wurden und keine, die Phytofluen, ζ -Carotin oder Neurosporin anhäufen.

Einen interessanten Aspekt liefert die Tatsache, daß bei der Mutante *car* "m1202" ζ -Carotin, Neurosporin und β -Zeacarotin im Vergleich zu den entsprechenden Komponenten aus dem Wildstamm ein anderes Absorptionsspektrum aufweisen (Abb.9,10,11). Möglicherweise kommt es als Folge der gestörten Metabolisierung der Intermediate verglichen mit dem Wildstamm, zu einer Verschiebung der relativen Anteile von trans- und cis-isomeren

Formen der Carotinoide. Ergebnisse aus früheren Untersuchungen bestätigen, daß bei *Fusarium* tatsächlich cis- und trans-isomere Formen verschiedener Carotinoide gebildet werden (Rau, unveröffentlicht).

Aus der Tatsache, daß der Pigmentgehalt der Mutanten car "m1202" und car "m1009" sehr ähnlich dem des Wildstammes ist, obwohl das Endprodukt der Biosynthesekette fehlt, konnte eventuell geschlossen werden, daß eine feed-back Regulation durch das Endprodukt wie bei *Phycomyces* (Murillo und Cerda-Olmedo, 1976; Cerda-Olmedo, 1985), bei *Fusarium aquaeductum*, analog zu dem nahe verwandten Pilz *Gibberella fujikuroi* (Avalos und Cerda-Olmedo, im Druck) nicht vorhanden ist.

Sowohl Mutante car "m1202", als auch Mutante car "m1009" synthetisieren nicht nur nach Belichtung vom Wildstamm abweichende Pigmentgemische, sondern auch, wenn sie ausschließlich im Dunkeln gehalten werden. Daraus könnte geschlossen werden, daß die von Theimer und Rau (1970, 1972) diskutierten Isoenzym-systeme für die "Dunkel-" und lichtinduzierte Synthese zumindest nicht zwei voneinander unabhängige Systeme darstellen.

Im Gegensatz zu den "Biosynthesemutanten" car "m1202" und car "m1009" handelt es sich bei der Mutante rd-1 (Theimer, 1968), um eine Regulationsmutante, die schon im Dunkeln große Mengen an Pigmenten synthetisiert und nach Belichtung eine gesteigerte Pigmentsynthese aufweist. Qualitativ unterscheiden sich die von Wildstamm und Mutante rd-1 synthetisierten Carotinoidgemische nicht, sodaß eine Mutation, die die carotinoidsynthetisierenden Enzyme betrifft, hier ausgeschlossen werden kann.

*Wirkung von UV-B-Strahlung auf Carotinoidsynthesefähigkeit
und Atmung*

Als Indikatoren für die schädigende Wirkung von UV-B-Strahlung wurde zum einen die Fähigkeit zur Carotinoidsynthese herangezogen, die bei *Fusarium* besonders gut untersucht ist (Lit. siehe Rau, 1980) und welche, wie Huber-Willer (1982) an Hand der Überlebensrate durch Strahlung geschädigten Myzels zeigen konnte, als Maß für die Zellschädigung betrachtet werden kann, und zum anderen die Zellatmung, welche Aussagen über die Stoffwechselaktivität und Vitalität des Pilzes zuläßt. Die Wirkung von UV-B-Strahlung auf die Carotinoidsynthesefähigkeit ist gerade unter dem Aspekt der möglichen Schutzfunktion der Carotinoide gegenüber UV-B von besonderem Interesse: die Untersuchungen sollten Aussagen darüber zulassen, ob und in welchem Umfang gerade UV-B-Strahlung, gegen die die Carotinoide möglicherweise schützen, auch die Synthese eben dieser Pigmente steuert.

Die Ergebnisse zeigen, daß durch relativ kurze Bestrahlungszeiten mit UV-B die Synthese von Carotinoiden ausgelöst wird. Eine Verlängerung der Bestrahlungsdauer führt jedoch dazu, daß die schädigende Wirkung der Strahlung allmählich die induzierende überwiegt, sodaß die Mengen von durch UV-B-Bestrahlung zusätzlich gebildeten Carotinoiden abnimmt, bis schließlich durch die UV-B-Strahlung keine zusätzlichen Carotinoide mehr synthetisiert werden. Ähnlich der ebenfalls durch UV-B-Strahlung induzierten Synthese der als UV-B-Schutzpigmente diskutierten Flavonoide (Lit. siehe Wellmann et al., 1986) ist also auch die Synthese der Carotinoide empfindlich gegenüber UV-B-Strahlung.

Der Ort der primären Schädigung, d.h. das "target", an dem die UV-B-Strahlung angreift und schließlich zu einer Herabsetzung der Carotinoidsynthesefähigkeit führt, ist noch unklar. Die Schädigung könnte z.B. auf der Ebene der Photorezeption und der sich anschließenden Redoxprozesse (Rau, 1975) stattfinden,

was auf Grund der raschen Membrandestruktion durch Einwirkung von UV-B-Strahlung (was durch den Efflux radioaktiv markierten Methionins aus dem Myzel deutlich wird (Kapitel IV. 2.4.)) durchaus plausibel wäre. Weiter könnte auch eine Schädigung auf der Ebene der DNA eintreten, welche besonders das "target" für kurzwellige Strahlung ist, weil sie gerade Strahlung dieses spektralen Bereiches ($<320\text{nm}$) sehr stark absorbiert. Eine Folge der DNA-Schädigung könnte sein, daß die Transkription von Genen gestört und folglich die Synthese der für die lichtinduzierte Carotinoidbildung notwendigen m-RNA-species blockiert ist. Eine primäre Schädigung der DNA bei zu intensiver Einstrahlung von UV-B liegt wahrscheinlich der Phytochrom-abhängigen Anthocyansynthese bei Senfkotyledonen (Wellmann et al., 1984) und der durch UV-B-Stress bei Bohnen ausgelösten Isoflavonoidsynthese (Beggs, 1985) zugrunde, da in beiden Fällen der UV-Effekt in hohem Maße photoreaktivierbar ist (Wellmann et al., 1986).

Die in Kapitel IV. 2.4. beschriebenen Ergebnisse zeigen, daß UV-B zu einer raschen Hemmung des Einbaus radioaktiven Methionins in Proteine führt. Man könnte folglich annehmen, daß möglicherweise zusätzlich zu den eben diskutierten "targets" DNA und Membranen auch Komponenten der Proteinsynthese geschädigt werden (Ribosomen, t-RNA-species, Enzyme), obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, daß die Proteinsynthese vielleicht als Folge einer gestörten Transkription zum Erliegen kommt. Die beobachtete Abnahme der Carotinoidsynthesefähigkeit durch relativ lange Bestrahlung mit UV-B könnte also auch durch die geringere Synthese der carotinoidsynthetisierenden Enzyme selbst verursacht werden.

Ein weiteres Kriterium, an Hand dessen die Schädigung durch UV-B-Strahlung beurteilt wurde, war, wie schon gesagt, die Zellatmung. Auch bei der Schädigung der Atmung durch UV-B-Strahlung ist die Frage nach dem "target" noch nicht geklärt. Da eine Hemmung der Atmung jedoch zum Teil schon nach relativ kurzen Bestrahlungszeiten beobachtet werden konnte, scheinen hierbei Schädigungen auf der Ebene der DNA zunächst nicht aus-

schlaggebend zu sein, weil sich diese sehr wahrscheinlich erst nach längerer Zeit manifestieren würden, z.B. in Abhängigkeit von dem jeweiligen turn-over der beteiligten Enzyme. Eine schnelle Reduzierung der Atmungsrate könnte eine Folge der Desintegration der Mitochondrienmembran sein und/oder eine Inaktivierung bestimmter Komponenten der Atmungskette, wie sie z.B. Brodie et al. (1979) für Naphtochinone und Epel (1973) für die Cytochromoxidase nachweisen konnten. Weiter könnte auch eine Hemmung der Glucoseaufnahme, d.h. ein Mangel des zu veratmenden Substrates, eine Ursache für den Rückgang der Atmungsrate sein. So konnten Robb und Peak (1979) zeigen, daß UV-Strahlung die Aufnahme von Lactose bei *E. coli* negativ beeinflusst. Die schnelle Hemmung der Methioninaufnahme durch UV-B-Strahlung (Kapitel IV. 2.4.) spricht dafür, daß tatsächlich eine rasche Schädigung von Transportmechanismen durch UV-B-Strahlung eintritt.

Bei einigen Versuchen (Kapitel IV. 2.3.) wurde das Absinken der Atmungsrate während der sich an die UV-B-Bestrahlung anschließenden 24-stündigen Dunkelinkubation beobachtet. Dies könnte zum einen als Folge ständig zunehmenden Substratmangels interpretiert werden, zum anderen könnte hier auch die gestörte Neusynthese von Enzymen, die für Veratmung der Glucose Voraussetzung sind, eine Rolle spielen. Letzteres könnte vielleicht in direktem Zusammenhang mit einer Schädigung der DNA durch die UV-B-Einstrahlung stehen.

Einfluß einer die Carotinoidsynthese auslösenden Vorbelichtung auf die durch UV-B ausgelösten Schädigungen

Um die Schutzfunktion der Carotinoide zu klären, wurde der Einfluß einer die Carotinoidsynthese auslösenden Vorbelichtung auf die Empfindlichkeit gegenüber anschließender UV-B-Bestrahlung beim Wildstamm und den Mutanten *car* "m1202" und *rd-1* vergleichend untersucht. Die Voraussetzungen für einen derartigen Vergleich, nämlich vergleichbare Empfindlichkeiten der einzelnen Stämme, sind, wie die Ergebnisse (Kapitel IV. 2.1.) zeigen, erfüllt; unterschiedliche Sensitivitäten ohne

eine die UV-B-Empfindlichkeit beeinflussende Vorbehandlung können also ausgeschlossen werden.

Beim Wildstamm, Mutante car "m1202" und Mutante rd-1 führt eine Vorbelichtung zu einer geringeren UV-B-Empfindlichkeit (Kapitel IV.2.2.). Aus der Tatsache, daß sich der schützende Einfluß erst nach einer gewissen lag-Phase manifestiert, kann geschlossen werden, daß de novo ein "Schutzmechanismus" gebildet wird, und nicht die Lichtaktivierung eines potentiell schützenden "Faktors", ähnlich der Photolyase (Jagger und Stafford, 1965), vorliegt. Dies könnte als Argument für die Schutzfunktion der Carotinoide betrachtet werden, weil sie ja erst nach einer lag-Phase gebildet werden.

Weiter spricht für die schützende Wirkung der Carotinoide, daß die Vorbelichtung, welche bei den einzelnen Stämmen ja zur Synthese unterschiedlicher Pigmentgemische bzw. Pigmentmengen (Tab.1) führt, nicht bei allen drei Stämmen gleich wirksam ist und die dadurch erzielte "photoprotection" unterschiedlich ist. Da der Wildstamm nach Vorbelichtung weniger empfindlich ist als die Mutante car "m1202", obwohl ungefähr die gleichen Pigmentmengen zum Zeitpunkt der UV-B-Bestrahlung vorlagen, kann geschlossen werden, daß die Carotinoide, die vom Wildstamm synthetisiert werden und zum Großteil mehr als neun Doppelbindungen besitzen, einen besseren Schutz darstellen als die von Mutante car "m1202" gebildeten gesättigteren Carotinoide. Dies steht in guter Übereinstimmung mit den Daten, die aus der Literatur bekannt sind, wonach nur Carotinoide mit mehr als neun Doppelbindungen aggressiven Singlet-Sauerstoff, der durch die Bestrahlung mit UV-B entsteht, quenchen können (Mathews-Roth und Krinsky, 1970; Mathews et al., 1974) und so einen effektiven Schutz bewirken. Dennoch zeigen die Ergebnisse, wie schon gesagt, daß auch das von Mutante car "m1202" synthetisierte Pigmentgemisch aus Phytoen, ζ -Carotin und Neurosporin ebenfalls einen gewissen Schutz darstellt. Sehr wahrscheinlich wirkt Phytoen, welches gerade im UV-B-Bereich maximale Absorption aufweist, ähnlich den Flavonoiden (Wellmann et al., 1986) als Schirmpigment und ist so für die geringere Sensitivität vorbelichteten Myzels

verantwortlich. Daß die höhere Toleranz belichteter Proben der Mutante car "m1202" tatsächlich in erster Linie auf Phytoen zurückzuführen ist und nicht auf ζ -Carotin und Neurosporin, wird durch folgendes Resultat bestätigt: 30 und 180 min. lang vorbelichtetes Myzel der Mutante car "m1202", welches zum Zeitpunkt der UV-B-Bestrahlung unterschiedliche Mengen an Phytoen, aber gleiche Mengen an ζ -Carotin und Neurosporin enthält, weist verschiedene UV-B-Sensitivität auf.

Obwohl Carotinoide, wie eben erläutert wurde, sehr wahrscheinlich einen gewissen Schutz darstellen, weist die Mutante rd-1, trotz ihres hohen Pigmentgehaltes, verglichen mit den anderen Stämmen keine höhere Toleranz gegenüber UV-B-Strahlung auf.

Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, daß bei Mutante rd-1 der größte Anteil an Carotinoiden nicht in Membranen, sondern in Lipidglobuli lokalisiert ist (Mitzka-Schnabel et al., 1981) und dadurch sehr wahrscheinlich ein effektives Quenchen von Singlet-Sauerstoff nicht möglich ist. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die durch die Belichtung gebildeten Carotinoide sehr wahrscheinlich im Sinne einer "photoprotection" (Jagger, 1985) einen Schutz vor UV-B-Strahlung gewährleisten und daß dabei das Quenchen aggressiven Singlet-Sauerstoffs durch die ungesättigteren Carotinoide einen besseren Schutz bietet als das Abschirmen des Pilzmyzels von schädigender UV-B-Strahlung, wie es durch Phytoen geschieht. Neben dem Quenchen von Singlet-Sauerstoff und der Absorption von UV-B konnten die Carotinoide auch als Stabilisatoren der Membran (Lit. siehe Schrott, 1985), welche wie schon erwähnt ein wichtiges "target" ist (Kapitel IV. 2.4.), zu einer geringeren Schädigung führen.

Ähnlich der lichtabhängigen Bildung von Flavonoiden (Wellmann et al., 1986) kann also die lichtinduzierte Carotinoidsynthese als aktive Anpassung an das Strahlungsklima der Umgebung betrachtet werden. Eine derartige Pigmentbildung muß jedoch strikt unterschieden werden von Pigmentbildungen, welche durch Licht-Stress ausgelöst werden, wie z.B. die Isoflavonoidsynthese bei *Phasaeolus* (Beggs, 1985) und die also keine adaptive Reaktion auf Umwelteinflüsse darstellen.

Folgende Ergebnisse der Versuche mit Mutante rd-1 weisen jedoch darauf hin, daß neben den Carotinoiden sehr wahrscheinlich noch andere Faktoren zu der nach Blaubelichtung beobachteten "photoprotection" beitragen: im Vergleich zu nicht vorbelichteten Proben weisen die 30 und 180 min. lang vorbelichteten Proben einen höheren Carotinoidgehalt auf, der jedoch unabhängig von der Dauer der Vorbelichtung ist (da die Carotinoidsynthese bei der Mutante rd-1 schon nach 1-minütiger Belichtung nahezu 100%-ig gesättigt ist); dennoch werden die 180 min. lang vorbelichteten Proben weniger durch UV-B geschädigt als die 30 min. lang vorbelichteten (Kapitel IV. 2.2.). Weiter wurde gezeigt, daß vorbelichtetes Myzel der Mutante rd-1 weniger durch UV-B geschädigt wird als ausschließlich im Dunkeln gehaltenes, aber durch verlängerte Akkommodation starker pigmentiertes Myzel: der Schutz durch die Carotinoide allein beim nicht belichteten Myzel war also offensichtlich geringer als der Schutz, welcher durch die Vorbelichtung erzielt wurde (Kapitel IV. 2.2.).

Auf welche Art und Weise könnte eine Vorbelichtung neben den Carotinoiden schützend wirken? Wie in der Einleitung beschrieben, sind aus der Literatur (Lit. siehe Jagger, 1985) zwei grundsätzlich verschiedene derartig wirkende Mechanismen bekannt: zum einen muß hier an einen Schutz gedacht werden, der durch die Vorbelichtung ausgelöst wird und demnach im Sinne einer "photoprotection" zu einer geringeren Schädigung führt und ähnlich den nach Lichtinduktion gebildeten Carotinoiden wirkt; zum anderen wäre auch ein durch Belichtung induzierbares Reparatursystem denkbar, welches Schäden, die sich bereits manifestiert haben, wieder repariert.

Auf jeden Fall ausgeschlossen werden kann eine "photoprotection" durch "growth delay", wie sie Jagger und al. (1964) beschreiben, da unter den gegebenen "step-down"-Bedingungen ohnehin kein Wachstum mehr stattfindet. Wie in der Einleitung schon erläutert, werden in der Literatur (Swenson et al. 1975; Masinovsky et al., 1976) jedoch noch weitere Mechanismen beschrieben, die im Sinne einer "photoprotection" wirken und welche eventuell auch bei Fusarium wirksam werden könnten.

Denkbar wäre eine als "photoprotection" wirkende qualitative oder quantitative Veränderung der Lipide der Membran, welche wie schon gesagt ein wichtiges "target" für UV-B-Strahlung darstellt. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, weil eine Blaubeleuchtung zu keinen Veränderungen der Menge an Phospholipiden und des Phospholipidmusters führt, der Saturierungsgrad der Fettsäuren nicht beeinflußt wird und die Menge an Sterinen sich nahezu nicht ändert (Kapitel IV. 3.).

Denken könnte man an die Bildung oder Aktivierung eines Enzymsystems vergleichbar dem NADP-/Glutathion-/Ascorbat-abhängigen System (Lit. siehe Mohr und Schopfer, 1978) oder eines Enzyms ähnlich der Katalase, welches für die Detoxifikation aggressiver Sauerstoff-species sorgt. So wird bei Pflanzen tatsächlich die Aktivität der Ascorbatoxidase, die vielleicht eine Rolle beim Schutz vor Photooxidation spielt (Tanaka et al., 1985), durch Licht über das Phytochromsystem gesteuert (Lit. siehe Schopfer und Mohr, 1978). In Analogie dazu könnte also bei *Fusarium*, bei dem das Phytochrom nicht vorhanden ist (Schrott et al., 1982), eine Steuerung entsprechender Enzymaktivitäten über das in der Evolution wahrscheinlich früher entstandene Cryptochrom (Senger und Briggs, 1981) erfolgen.

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse kann nicht auf ein lichtinduziertes Regenerationsvermögen, wie es von Schrott (1985) diskutiert wurde, geschlossen werden, weil vorbelichtetes Myzel sich nicht schneller von den durch UV-B-Strahlung ausgelosten Schädigungen erholt als nicht vorbelichtetes. Aus dem bisher gesagten wird also deutlich, daß noch nicht geklärt ist, auf welche Weise eine Vorbelichtung unabhängig von den Carotinoiden die UV-B-Empfindlichkeit beeinflussen kann.

Einfluß der Akkommodationsdauer auf die durch UV-B ausgelösten Schädigungen

Aus folgenden Ergebnissen in Kapitel IV. 2.3. kann geschlossen werden, daß neben den Carotinoiden und einer Vorbelichtung auch der physiologische Zustand des Myzels die Empfindlichkeit gegenüber UV-B-Strahlung beeinflusst: 24 Stunden im Dunkeln unter Minimalbedingungen gehaltenes Myzel wird weniger durch UV-B geschädigt als nur 2 Stunden inkubiertes. Die Resultate der Versuche mit Mutante *rd-1*, welche im Dunkeln große Mengen an Carotinoiden synthetisiert, zeigen, daß die Carotinoide dabei einen zusätzlichen Schutz bewirken. Möglicherweise kommt es während dieser Akkommodation zu einer aktiven Anpassung an die negativen Umwelteinflüsse, die zu einer höheren Toleranz gegenüber schädigender UV-B-Strahlung führen. Es könnte sein, daß die unter "step-down"-Bedingungen in großen Mengen akkumulierten Sterine (Kap. IV.3.) einen Schutz vor UV-B-Strahlung bewirken. Zum einen könnten sie, ähnlich wie es auch für die Carotinoide diskutiert wird (Lit. siehe Schrott, 1985), zu einer Stabilisierung der Membran führen, (Lit. siehe Stryer, 1981), einem wichtigen "target" für UV-B-Strahlung (Kapitel IV. 2.4. und 2.5.); die Ergebnisse des Abschnitts IV.2.4. sprechen dafür, daß die Membran eines 24 Stunden akkommodierten Myzels tatsächlich stabiler ist: die Zerstörung der Membran als Diffusionsbarriere, gemessen am Efflux nicht in Protein eingebauten Methionins, erfolgt bei 24 Stunden akkommodiertem Myzel langsamer als bei 2 Stunden akkommodiertem. Zum anderen könnten die Sterine als im UV-B-Bereich absorbierende Substanzen ähnlich dem Phytoen (s.o.) bei Mutante *car "m1202"* und den Flavonoiden (Wellmann et al., 1986) als Schirmpigmente einen Teil der schädigenden Strahlung absorbieren. Für einen Schutz durch die Sterine spricht auch die relativ geringe UV-B-Empfindlichkeit der im Dunkeln keine Carotinoide synthetisierenden Mutante *car "m1009"*, welche verglichen mit den anderen Stämmen jedoch größere Mengen an Sterinen bildet.

Eine weitere Ursache für die geringere Empfindlichkeit länger

akkommodierten Myzels könnte auch die Zunahme des Sättigungsgrades der Fettsäuren während der Akkommodation sein. Klamen und Tuveson konnten (1982) zeigen, daß das Ausmaß der Membranschädigung durch UV-Strahlung bei *E. coli* vom Sättigungsgrad der Fettsäuren abhängt.

Auch Mechanismen, die schon im Zusammenhang mit dem gesteigerten Schutz nach Vorbelichtung diskutiert wurden (z.B. Enzyme, die aggressive Sauerstoff-species abfangen) konnten auch nach einer verlängerten Akkommodation wirksam werden und zu einer geringeren Schädigung des Myzels beitragen.

Einfluß von UV-B-Strahlung auf Methioninaufnahme und -einbau

Ein primäres "target" der UV-B-Strahlung ist, wie schon gesagt, die Zellmembran, welche ja zusammen mit der Chitinzellwand diejenige Schicht ist, auf die die Strahlung zunächst auftrifft. Dafür spricht nicht nur die schnelle Hemmung der Atmung (Kapitel IV. 2.1., 2.2. und 2.3.), sondern auch die schnelle Hemmung der Methioninaufnahme (Kapitel IV. 2.4.). Wie schon im Zusammenhang mit der Hemmung der Atmung diskutiert wurde (s.o.), sind derartige schnelle Hemmwirkungen wahrscheinlich keine Folge von Schädigungen der DNA. Die eingestrahlte UV-B-Intensität und die Dauer der Akkommodation sind bei der Schädigung der Methioninaufnahme von entscheidender Bedeutung: während eine Bestrahlungsstärke von 400mW/m^2 unabhängig von der Dauer der Akkommodation mit zunehmender Bestrahlungszeit zu einer vollständigen Hemmung der Aufnahme von Methionin führt, wird durch eine Bestrahlungsstärke von 60mW/m^2 die Aufnahme von Methionin bei 2 Stunden akkommodierten Proben nicht vollständig gehemmt und bei 24 Stunden akkommodierten Proben nahezu nicht beeinflusst. Eine mögliche Ursache für die drastische Hemmung der Methioninaufnahme bei einer Intensität von 400mW/m^2 könnte die starke Schädigung der Membran sein, die zu einer zumindest teilweisen Zerstörung ihrer Funktion als Diffusionsbarriere und einem Efflux an im Myzel frei vorliegenden Methionin führt. Eine ähnliche Membranschädigung fand Huber-Willer (1982) durch Bestrahlung

mit UV-A; dabei muß allerdings beachtet werden, daß dafür wesentlich höhere Bestrahlungsintensitäten nötig waren, was für die große biologische Wirksamkeit von UV-B-Strahlung spricht.

Aus der Abnahme des prozentualen Anteils ungesättigterer Fettsäuren bei UV-B bestrahlten Proben (Kapitel IV.3.) konnte geschlossen werden, daß während der Einwirkung von UV-B eine Peroxidation von Membranlipiden stattfindet, was zu einer Desintegration der Membran führen könnte; eventuell kommt es zusätzlich zu einer oxidativen Zerstörung von Membranproteinen (Dean et al., 1987).

Im Gegensatz zu der Intensität von 400mW/m^2 bleibt bei einer Bestrahlungsstärke von 60mW/m^2 die Funktion der Membran als Diffusionsbarriere, welche ja eine Grundvoraussetzung für die Lebensfähigkeit eines Organismus ist (z.B. pH-Gradienten für Synthese von ATP bei der Atmungskettenphosphorylierung) erhalten. Dennoch kommt es auch hier bei nur zwei Stunden akkommodierten Proben zu einer Hemmung der Methioninaufnahme. Daraus konnte geschlossen werden, daß durch UV-B geringerer Intensität möglicherweise bestimmte Transportsysteme gehemmt werden. UV-B-Strahlung führt auch, wie schon im Zusammenhang mit der Hemmung der Carotinoidsynthesefähigkeit diskutiert wurde (s.o.), zu einer Hemmung der Proteinsynthese (IV. 2.4.). Das Ausmaß der Hemmung wird erwartungsgemäß von der eingestrahlten Bestrahlungsstärke bestimmt. Der Angriffspunkt der Strahlung ist, wie ebenfalls schon erläutert wurde, nicht bekannt. Möglicherweise spielen sogar auch hier Membranschädigungen eine Rolle: Proteinsynthese findet ja zum Teil auch an den Membranen des endoplasmatischen Reticulums statt. Auf jeden Fall ist die Hemmung der Proteinsynthese nicht als Folge der Hemmung der Methioninaufnahme und somit mangelnden Substratangebotes zu erklären, da auch zu dem Zeitpunkt, an dem noch freies Methionin im Myzel vorliegt, der Einbau von Methionin schon zum Stillstand kommt.

Die Proteinsynthese scheint demnach empfindlicher auf UV-B-Strahlung zu reagieren als die Methioninaufnahme; dafür spricht die Tatsache, daß auch bei 24 Stunden akkommodierten

Proben, bei denen die Methioninaufnahme nahezu unbeeinflusst von UV-B-Strahlung (60mW/m^2) weiterläuft, die Proteinsynthese während der Bestrahlung vollständig zum Erliegen kommt.

"Regenerationsfähigkeit" des Pilzes nach Bestrahlung mit UV-B

Aus den Ergebnissen in Kapitel IV. 2.5. geht deutlich hervor, daß sich *Fusarium* nach einer 4-stündigen Bestrahlung mit UV-B einer Intensität von 60mW/m^2 vollständig von bereits vorhandenen Schädigungen erholen kann. Eine Bestrahlungsstärke von 400mW/m^2 führt dagegen zu einer derart drastischen Schädigung von Methioninaufnahme und -einbau, daß zumindest während einer ca. 26-stündigen Dunkelinkubation keine Regeneration möglich ist. Ähnlich den durch UV-B-Strahlung ausgelösten Schädigungen (Kapitel IV. 2.4.) ist also auch die Regenerationsfähigkeit des Pilzes abhängig von der eingestrahltten UV-B-Intensität. Dies bedeutet, daß zumindest eine kurzzeitig auftretende Erhöhung der UV-B-Intensitäten in der Natur durchaus tolerierbar ist, sofern sie nicht bestimmte kritische Grenzwerte überschreiten.

Möglicherweise ist eine Voraussetzung für die Regenerationsfähigkeit des Pilzes das Vorhandensein möglichst intakter Membranstrukturen, welche wie schon erläutert wurde, nach einer Bestrahlung mit 60mW/m^2 vorliegen, nicht aber nach einer Bestrahlung mit 400mW/m^2 . Eine ähnliche Korrelation fand Huber-Willer (1982) für die Aufnahme und den Einbau radioaktiv markierten Uridins. Hier wurde gefolgert, daß die Membrandestruktion möglicherweise die Ursache für die Abtötung eines Organismus ist.

Welche Vorgänge dazu führen, daß sich das Myzel unter Minimalbedingungen von den durch UV-B verursachten Schädigungen erholt, ist noch unklar. Wie in der Einleitung geschildert, werden in der Literatur verschiedene Regenerationsphänomene beschrieben ("liquid-holding recovery", "minimal medium recovery"), bei denen die Reparatur geschädigter DNA-Sequenzen von Bedeutung ist.

Es konnte sein, daß gerade die gewählten "step-down"-

Bedingungen unter denen ein Wachstum des Pilzes und somit eine Replikation der DNA unterbleibt, extensive Reparaturen an der DNA erlauben. Da jedoch durch die UV-B-Einstrahlung eine Schädigung der Zellmembran auftritt, ist es wahrscheinlich, daß auch die Synthese von Membranbausteinen eine entscheidende Rolle bei der Regeneration spielt. Hinweise aus der Literatur lassen durchaus auf eine Beteiligung von Syntheseprozessen, welche besonders die Wiederherstellung der Membran betreffen, bei der Regeneration eines durch Strahlung geschädigten Organismus schließen. So beschreiben Moss und Smith (1981), daß für die Regeneration geschädigter Zellen von *E. coli* die Synthese von Membranbausteinen Voraussetzung war.

Bei Betrachtung aller Ergebnisse wird deutlich, daß unabhängig vom Gehalt an schützenden Carotinoiden, einer Vorbelichtung, welche zu einer "photoprotection" führt und der Dauer der Akkommodation an die Milieubedingungen bei Überschreiten einer bestimmten Dosis von UV-B-Strahlung eine deutliche Schädigung des Myzels auftritt. Ursache könnte eine Zerstörung der "Schutzmechanismen" durch UV-B zu hoher Dosis sein. Eine vollständige Photodestruktion von Carotinoiden erscheint nicht sehr wahrscheinlich, weil selbst eine 4-stündige Bestrahlung mit UV-B einer Intensität von 400mW/m^2 bei Mutante *rd-1* nur zu einer geringen Abnahme des Carotinoidgehaltes führt (Kapitel IV. 2.3.1.). Allerdings muß dabei beachtet werden, daß bisher noch nicht geklärt ist, in welchem Umfang die konstitutive Carotinoidsynthese der Mutante *rd-1* unter Einwirkung von UV-B-Strahlung noch weiterläuft und so möglicherweise ein "Ausbleichen" von Carotinoiden durch Neusynthese von Carotinoiden kompensiert wird.

Sehr wahrscheinlich ist die Kapazität der genannten "Schutzmechanismen" begrenzt und bei Überschreiten einer kritischen Dosis reicht ihr Potential nicht mehr aus, um den durch die Strahlung ausgelösten Schädigungen entgegenzuwirken, selbst wenn die "Schutzmechanismen" selbst in ihrer Funktion nicht beeinträchtigt würden. Da die für die vorliegenden Untersuchungen gewählten UV-B-Bestrahlungsstärken durchaus im Rah-

men der Intensitäten liegen, die unter den derzeit herrschenden Ozonbedingungen in der Stratosphäre auf die Erdoberfläche auftreffen können, ist also bei einer weiteren Abnahme der stratosphärischen Ozonschicht und einer entsprechenden Zunahme der UV-B-Strahlenbelastung mit einem wachsenden Risiko für die Organismen auf der Erde zu rechnen.

VI. Zusammenfassung

1. Anthropogene Einflüsse führen möglicherweise zu einer Reduktion der stratosphärischen Ozonschicht und somit zu einer Zunahme der UV-B-Strahlenbelastung für die Organismen auf der Erde. Große Bedeutung kommt deshalb allen "Mechanismen" zu, die einen Schutz vor UV-B-Strahlung darstellen. Carotinoide gelten als effektive Schutzpigmente, da sie eine Photodestruktion des Photosyntheseapparates bei phototrophen Organismen verhindern. Hauptziel dieser Arbeit war es am Beispiel des imperfekten Wasserpilzes *Fusarium aquaeductum* zu klären, ob Carotinoide bei chemotrophen Organismen eine Schutzfunktion gegenüber UV-B-Strahlung besitzen und ob die lichtinduzierte Carotinoidsynthese im Sinne einer "photoprotection" (Jagger, 1985) wirkt und als aktive Anpassung an das Strahlungsklima der Umwelt zu betrachten ist.

Die Untersuchungen sollten einen Beitrag zur Abschätzung des Risikos leisten, welches mit einer Abnahme der stratosphärischen Ozonschicht verbunden ist.

2. Zur Klärung der Schutzfunktion der Carotinoide wurden vergleichende Studien am Wildstamm und Mutanten von *Fusarium aquaeductum* durchgeführt. Dabei handelte es sich zum einen um eine Mutante mit einer vom Wildstamm abweichenden Regulation der Carotinoidsynthese (Mutante rd-1) und zum anderen um Mutanten, die, wie schon aus ihrem gelben (Mutante car "m1202") bzw. weißen (Mutante car "m1009") Phänotyp ersichtlich ist, ein anderes Pigmentgemisch synthetisieren. Als Grundvoraussetzung mußte der zeitliche Verlauf der Pigmentsynthese (Akkumulationskinetik) untersucht, die Dosis-Effekt-Kurve bei den einzelnen Stämmen ermittelt und eine Analyse der gebildeten Carotinoidgemische durchgeführt werden.

3. Sowohl die Akkumulationskinetiken, als auch die Dosis-Effekt-Kurven weisen beim Wildstamm und den Mutanten car "m1202" und car "m1009" annähernd denselben Verlauf auf: die Pigmentsynthese ist nach ca. 12 Stunden abgeschlossen; die synthetisierte Carotinoidmenge hängt logarithmisch von der eingestrahlten Dosis ab; die Dosis-Effekt-Kurve ist deutlich zweiphasig.
4. Die Pigmentzusammensetzung bei den Mutanten car "m1202" und car "m1009" weicht gravierend vom Wildstamm ab (Biosynthesemutanten). Während der Wildstamm nach Licht-induktion hauptsächlich Neurosporaxanthin, Torulin, γ -Carotin und Lycopin akkumuliert, synthetisiert die Mutante car "m1202" in erster Linie die relativ ungesättigten Carotinoide Phytoen, ζ -Carotin und Neurosporin und die Mutante car "m1009" nur Phytoen. Beide Mutanten sind "leaky", wobei dies bei der Mutante car "m1202" ausgeprägter ist als bei der Mutante car "m1009".
5. Die Mutante rd-1 synthetisiert schon im Dunkeln große Mengen an Carotinoiden ("Regulationsmutante"); eine Belichtung bewirkt eine gesteigerte Pigmentsynthese; dabei führt schon eine 1-minütige Belichtung zu einer nahezu 100%-igen Sättigung der Reaktion. Qualitativ unterscheidet sich das von Mutante rd-1 gebildete Carotinoidgemisch nicht von dem des Wildstammes.
6. Um die Frage nach dem Schutz durch Carotinoide gegenüber UV-B-Strahlung zu klären, wurde der Einfluß einer die Carotinoidsynthese auslösenden Vorbelichtung auf die durch UV-B ausgelösten Schädigungen auf der Ebene der Carotinoidsynthesefähigkeit und der Atmung bei den einzelnen Stämmen vergleichend untersucht. Bei einer Interpretation der Ergebnisse muß jedoch bedacht werden, daß eine Vorbelichtung neben der Carotinoidsynthese möglicherweise noch andere Mechanismen auslösen kann, die im Sinne einer "photoprotection" oder eines "induzierbaren

Reparatursystems" wirken konnten (Jagger, 1985).

7. Eine Vorbelichtung, die ja bei den verschiedenen Stämmen die Synthese qualitativ bzw. quantitativ unterschiedlicher Carotinoide induziert, führt bei allen Stämmen zu einer gesteigerten Toleranz gegenüber UV-B-Strahlung; das Ausmaß des durch die Vorbelichtung erzielten Schutzes war bei den verschiedenen Stämmen jedoch unterschiedlich, was für die Schutzfunktion der Carotinoide spricht. Es zeigte sich dabei, daß die ungesättigteren Carotinoide des Wildstammes im Vergleich zum Phytoen, ζ -Carotin und Neurosporin der Mutante *car* "m1202", einen besseren Schutz gewährleisten. Dies stimmt mit den Daten aus der Literatur überein (Krinsky, 1979), wonach nur Carotinoide mit mehr als neun konjugierten Doppelbindungen Singlet-Sauerstoff, der durch Bestrahlung entsteht, quenchen können. Neben dem Schutz durch Quenchen von Singlet-Sauerstoff wird die Rolle des Phytoens als Schirmpigment vor UV-B-Strahlung diskutiert.
8. Folgende Ergebnisse der Versuche mit Mutante *rd-1* sprechen für die Existenz eines zusätzlichen durch Blaulicht ausgelösten "Mechanismus", welcher neben den Carotinoiden eine geringere Empfindlichkeit bewirkt: mit zunehmender Dauer der Vorbelichtung, die jedoch in jedem Fall zu einer Sättigung der Carotinoidsynthese und so zu einer gleich starken Pigmentierung führt, nimmt die UV-B-Empfindlichkeit des Myzels ab; vorbelichtetes Myzel wird weniger durch UV-B-Strahlung geschädigt als durch eine verlängerte Akkommodation stärker pigmentiertes Myzel.
9. Neben den Carotinoiden beeinflussen also noch andere Faktoren das Ausmaß der durch UV-B-Strahlung ausgelösten Schädigung. Es wurde untersucht inwieweit diese Schäden vom physiologischen Zustand des Myzels abhängig sind und welche Rolle dabei die Carotinoide spielen. Dazu wurde

die Empfindlichkeit der Mutante rd-1, die im Dunkeln große Mengen an Carotinoiden akkumuliert, des Wildstammes, der im Dunkeln nur geringe Mengen synthetisiert und der Mutante car "m1009", die im Dunkeln keine Carotinoide bildet, in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer im Minimalmedium (Akkommodation) untersucht. Eine verlängerte Akkommodation führt bei allen Stämmen zu einer gesteigerten Toleranz. Möglicherweise kommt es während der Akkommodation zu einer aktiven Anpassung an die "step-down" Bedingungen des Mediums, woraus eine geringere Empfindlichkeit des Myzels gegenüber UV-B resultieren könnte. Die Synthese von Carotinoiden führt zu einer Verstärkung dieses Effektes. Die während der Akkommodation akkumulierten Sterine könnten als Schirmpigmente einen zusätzlichen Schutz bieten.

10. Um Aussagen über den Angriffspunkt und die Wirkungsweise von UV-B-Strahlung machen zu können, wurde der Einfluß der Akkommodationsdauer auch auf die Aufnahme und den Einbau radioaktiv markierten L-Methionins untersucht. UV-B-Strahlung führt in Abhängigkeit von der eingestrahlten Bestrahlungsstärke zu einer drastischen, voneinander unabhängigen Hemmung von Aufnahme und Einbau von Methionin; der Einbau von Methionin in Protein reagiert dabei empfindlicher auf UV-B-Strahlung als die Aufnahme von Methionin. Eine Schädigung der Membran als Diffusionsbarriere tritt bei einer Bestrahlungsstärke von 400 mW/m^2 ein, nicht jedoch bei 60 mW/m^2 . Die Membran wird als ein mögliches "target" der UV-B-Strahlung diskutiert.

Die Wirksamkeit einer verlängerten Akkommodationsdauer ist abhängig von der Intensität der UV-B-Strahlung: ein deutlicher Schutz durch längere Akkommodation konnte bei einer Bestrahlungsstärke von 60 mW/m^2 nachgewiesen werden.

11. Große Bedeutung kommt der Frage nach dem "Regenerationsvermögen" nach schädigender Bestrahlung zu.

Eine "recovery" konnte nach Inkubation im Minimalmedium bei Aufnahme und Einbau von radioaktiv markiertem Methionin nach einer 4-stündigen Bestrahlung mit UV-B einer Intensität von 60mW/m^2 nachgewiesen werden; dagegen war nach einer 4-stündigen Bestrahlung mit einer Intensität von 400mW/m^2 keine "Erholung" möglich. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen der Integrität der Membran und der Fähigkeit zur Regeneration.

12. Da die Membran ein wichtiges "target" für UV-B-Strahlung darstellt, konnte die Empfindlichkeit des Myzels nicht nur von den Carotinoiden und dem physiologischen Zustand beeinflusst werden, sondern auch von der Lipidzusammensetzung der Membran abhängen. Es wurde deshalb beim Wildstamm und den Mutanten eine Lipidanalyse durchgeführt und untersucht, ob eine Blauvorbelichtung bzw. eine verlängerte Akkommodation, die ja unabhängig von den Carotinoiden zu einer größeren Toleranz gegenüber Strahlung führen, zu Veränderungen auf der Lipidebene führen.

13. Wildstamm und Mutanten unterscheiden sich nicht auf der Ebene der Phospholipide. Ebenso weisen Wildstamm, Mutante rd 1 und car "m1202" den nahezu gleichen Sterin-gehalt auf; nur Mutante car "m1009" synthetisiert eine größere Menge an UV-B absorbierenden Sterinen, was eventuell eine Ursache für ihre vergleichsweise geringere UV-B-Empfindlichkeit sein konnte.

Eine Blauvorbelichtung führt zu keinen Änderungen des Lipidmusters und -gehaltes. Während der Akkommodation werden große Mengen an Sterinen synthetisiert, die vielleicht einen zusätzlichen Schutz bewirken (vgl. Punkt 9).

14. Unabhängig von dem Vorhandensein schützender Faktoren wurde bei überschreiten einer bestimmten UV-B-Dosis stets eine mehr oder weniger starke Schädigung festgestellt. Da die gewählten Intensitäten im Rahmen der Intensitäten lagen, welche unter den derzeit herrschenden Ozonbedingungen in der Stratosphäre auf die Erdoberfläche auftreffen können, ist folglich mit einer zunehmenden Reduktion der Ozonschicht ein deutliches Risiko für die Organismen auf der Erde verbunden.

VII. Literatur

- Anwar, M., T. Khan, J. Prebble and P.F. Zagalsky (1977) Membrane-bound carotenoid in *Micrococcus luteus* protects naphthochinon from photodynamic action. *Nature* **270**, 538-540.
- Aragon, C.M., F.J. Murillo, M. de la Guardia and E. Cerda-Olmedo (1976) An enzyme complex for the dehydrogenation of phytoene in *Phycomyces*. *Eur.J.Biochem.* **63**, 71.
- Bhattacharjee, S.K. (1977) Unstable Protein mediated ultraviolet light resistance in *Anacystis nidulans*. *Nature* **269**, 82-83.
- Beggs, C.J., U. Schneider-Ziebert and E. Wellmann (1985) UV-B-radiation and adaptive mechanisms in plants. In: Stratospheric ozone reduction, solar ultraviolet radiation and plant life, Worrest (ed.), Springer.
- Beggs, C.J., A. Stolzer-Jehle and E. Wellmann (1985) Isoflavonoid formation as an indicator of UV-stress in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaves. The significance of photorepair in assessing potential damage by increased solar UV-B radiation. *Plant Physiol.* **79**, 630-634.
- Beggs, C.J., E. Wellmann und H. Griesebach (1986) Photo-control of flavonoid biosynthesis. In: R.E. Kendrick und G.H.M. Kronenberg (eds.), *Photomorphogenesis in Plants*. Dr W. Junk N.V., Amsterdam.
- Beyer, R.E. (1959) The effect of ultraviolet on mitochondria. II. Restoration of oxidative phosphorylation with vitamin K₁ after near-ultraviolet treatment. *J.Biol.Chem.* **234**, 688-692.
- Bindl, E. (1968) Untersuchungen über den Verlauf der lichtabhängigen Carotinoidsynthese von *Fusarium aquaeductum*. Dissertation, Universität München.
- Bindl, E., W. Lang und W. Rau (1970) Untersuchungen über die lichtabhängige Carotinoidbiosynthese. VI. Zeitlicher Verlauf der Synthese der einzelnen Carotinoide bei *Fusarium aquaeductum* unter verschiedenen Induktionsbedingungen. *Planta* **94**, 156-174.
- Blanc, P.L., R.W. Tuveson and M.L. Sargent (1976) Inactivation of carotenoidproducing and albino strains of *Neurospora crassa* by visible light, blacklight, and ultraviolet radiation. *J. Bacteriol.* **125**, 616-625.
- Blum, H.F. (1941) *Photodynamic Action and Diseases Caused by Light*. Reinhold, New York.

- Brash, D.E. and W.A. Hazeltine (1982) UV-induced mutation hotspots occur at DNA damage hotspots. *Nature* 298, 189-192.
- Brodie, A.F., I.D. Sutherland, S.H. Lee (1979) The specificity of quinons for restoration of active transport of solutes and oxidative phosphorylation. In: *Vitamin K Metabolism and Vitamin-K-Dependent*, J.W. Suttie (ed.), University Park Press, Baltimore, pp. 193-202.
- Caldwell, M.M. (1971) Solar ultraviolet radiation and the growth and development of higher plants. In: *A.C. Giese (ed.), Photophysiology VI*, pp. 131-177.
- Cerda-Olmedo, E. (1985) Carotene Mutants of *Phycomyces*. In: *Methods of Enzymology*, Vol. 110, J.H. Law and H.C. Rilling 110, pp. 220-225.
- Cerda-Olmedo, E. (1987) Carotene. In: "*Phycomyces*", E. Cerda-Olmedo und E.D. Lipson (eds.). Cold Spring Harbo Laboratory, pp. 199-222.
- Chamberlain, J. and S.H. Moss (1987) Lipid Peroxidation and other Membrane Damage Produced in *Escherichia coli* K1060 by Near UV-Radiation and Deuterium Oxid. *Photochem. Photobiol.* 45, 625-630.
- Chatterjee, S. and S.K. Bhattacharjee (1976) Differential response of cells grown in light and dark to near-ultraviolet light. *Nature*, 259, 676-677.
- Cogdell, R.J. (1985) Carotenoids in Photosynthesis. *Pure Appl. Chem.* 57, 723-728.
- Cutcher, P. (1974) Stratospheric ozone depletion and solar ultraviolet radiation on earth. *Science* 184, 13-19.
- Damm, I., Th. Braumann, L. H. Grimme (1985) Stability of Reaction Centre Preparations of Photosystem I In Relation to Carotenoid Composition. In: *Book Of Abstracts, 7th International Symposium on Carotenoids*, Munchen, p.30.
- Davidson, J.N. (1976) *The biochemistry of nucleic acids*. Chapman and Hall, London.
- Davies, B.H. (1975) Carotenoids - Aspects of Biosynthesis and Enzymology. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.*, 88, 7-8.
- Dean, R.T. and K.H. Cheeseman (1987) Vitamin E Protects Proteins Against Free Radical Damage In Lipid Environments. *Biochem. and Biophys. Res. Com.* 148, 1277-1282.
- Doyle, R.J. and H.E. Kubitschek (1976) Near-ultraviolet light inactivation of energy-independent membrane transport system in *Saccharomyces cerevisiae*.

Photochem.Photobiol. **24**, 291-293.

Duell-Pfaff, N. und E. Wellmann (1982) Involvement of phytochrome and blue light receptor in UV-B induced flavonoid synthesis in parsley (*Petroselinum hortense Hoffm.*) cell suspension cultures. *Planta* **156**, 213-217.

Epstein, J.H. (1977) Effects of β -Carotene On Ultraviolet Induced Cancer Formation In The Hairless Mouse Skin. *Photochem.Photobiol.* **25**, 211-213.

Foote, C.S. and R.W. Denny (1968) Chemistry of singlet oxygen VII: Quenching by β -Carotene *J.Am.Chem.Soc.* **90**, 6233-6235.

Frosch, S. und H. Mohr (1980) Analysis of Light-controlled Accumulation of Carotenoids in Mustard (*Sinapis alba* L.) Seedlings. *Planta* **148**, 279.

Giese, A.C. (1971) Studies on Ultraviolet Radiation Action Upon Animal Cells. In: *Photobiology VII*, A.C. Giese (ed.), pp. 202-244.

Goad, L.J. and Goodwin, T.W. (1966) The Biosynthesis of Sterols in Higher Plants. *Biochem.J.* **99**, 735-746.

Goldstrohm, D.D. and V.G. Lilly (1965) The effect of light on the survival of pigmented and nonpigmented cells of *Dacryopinax spathularia* *Mycologia* **57**, 612-623.

Gollnick, K. und G.O. Schenk (1967) In: "1,4-Cycloaddition reactions". Hamer, J. (ed.) Academic, New York, pp. 225-344.

Goodwin, T.W. (1980) *The Biochemistry of the Carotenoids*, Vol.1, Plants, Second Edition, London, New York.

Griffiths, M., W.R. Sistrom, G. Cohen-Bazire and R. Y. Stanier (1955) Function of Carotenoids in Photosynthesis. *Nature*, **176**, 1211-1214.

Griggs, M. (1968) Absorption coefficients of ozone in the ultraviolet and visible region. *J.Chem.Phys.* **49**, 857-859.

Grobecker, A.J., S.C. Coroniti, R.H. Cannon (1974) The effects of stratospheric pollution by aircraft. Department of Transportation, Washington, Systems Development and Technology Dept., Rept.No.DOT-BT-75-50.

Hammond, A.L., T.H. Maugh (1974) Stratospheric pollution: Multiple threats to earth's ozone. *Science* **186**, 335-338.

Hazeltine, W.A. (1983) Ultraviolet repair and mutagenesis revisited. *Cell* **33**, 13-17.

- Hollaender, A. (1943) Effect of long ultraviolet and short visible radiation (3500-4900 Å) on *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **46**, 531-541.
- Howard-Flanders, P. (1981) Inducible repair of DNA. *Scientific Amer.* **245**, 72-80.
- Hsu, J., P.D. Forbes, L.C. Harber, E. Lakow (1975) Induction Of Skin Tumors in Hairless Mice By A Single Exposure To UV Radiation. *Photochem Photobiol.* **21**, 185-188.
- Huber-Willer, A. (1982) Untersuchungen über die phototoxischen Wirkungen in *Fusarium aquaeductuum* und seine Schutzmechanismen. Dissertation Universität München.
- Hull, H.M., H.L. Morton and J.R. Wharrie (1975) Environmental influences on cuticle development and resultant foliar penetration. *Bot. Rev.* **41**, 421-452.
- Ito, A. and T. Ito (1983) Possible involvement of membrane damage in the inactivation by broad-band near-UV radiation in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Photochem. Photobiol.* **37**, 395-401.
- Jagger, J., R.S. Wise and R.S. Stafford (1964) Delay in growth and division induced by near ultraviolet radiation in *Escherichia coli* B and its role in photoprotection and liquid holding recovery. *Photochem. Photobiol.* **3**, 11-24.
- Jagger, J. and R.S. Stafford (1965) Evidence for two mechanisms of photoreactivation in *Escherichia coli* B. *Biophysical*, **5**, 75-78.
- Jagger, J. (1967) Introduction to Research in Ultraviolet Photobiology. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, New York, 147-186.
- Jagger, J. (1972) Growth delay and Photoprotection induced by near-ultraviolet light. In: Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry. Vol.3, Part 1, U. Gallo and L. Santamaria (eds.), North-Holland Publishing, Amsterdam, pp. 381-401.
- Jagger, J. (1976) Ultraviolet inactivation of biological systems. In: "Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids, Vol. II, S.Y. Wang, ed., Academic Press, New York, 147-186.
- Jagger, J. (1985) Solar-UV Actions On Living Cells. Praeger Publishers, New York.
- Kandler O. und F. Schotz (1956) Untersuchungen über die photooxydative Farbstoffzerstörung und Stoffwechsell-
hemmung bei Chlorellamutanten und panaschierten Oenotheren. *Z. Naturforschung* **11b**, 708-718.

- Kelland, L.R., S.H. Moss and D.J.G. Davies (1983) Recovery of *Escherichia coli* K-12 from near ultra-violet radiation-induced membrane damage. *Photochem.Photobiol.* **37**, 617-622.
- Kelland, L.R., S.H. Moss and D.J.G. Davies (1984) Leakage of $^{86}\text{Rb}^+$ after ultraviolet irradiation of *Escherichia coli* K-12. *Photochem.Photobiol.* **39**, 329-335.
- Khan, A.U. (1978) Activated Oxygen: Singlet Molecular Oxygen and Superoxide Anion. *Photochem.Photobiol.* **28**, 615.
- Klamen, D.L. and R.W. Tuveson (1982) The effect of membrane fatty acid composition on the near-UV (300-400nm) sensitivity of *Escherichia coli* K1069. *Photochem.Photobiol.* **35**, 167-173.
- Koch, A.L., R.J. Doyle, and H.E. Kubitschek (1976) Inactivation of membrane transport in *Escherichia coli* by near-ultraviolet light. *J.Bacteriol.* **126**, 140-146.
- Kovacs, A.M., W. Rossing, D.H. Will III and M. Ruddat (1987) Carotene and Cytochrome c Dependent Mitotic Recombination and Killing in Response to Visible Light and UV-C In The Smut Fungus *Ustilago violacea*. *Photochem.Photobiol.* **45**, 493-499.
- Krinsky, N.I. (1968) The Protective Function Of Carotenoid Pigments. In: *Photophysiology*, A.C. Giese (ed.), Vol.III, Academic Press, New York, London, pp. 122-194.
- Krinsky, N.I. (1979) Carotenoid Protection Against Oxidation. *Pure Appl.Chem.* **51**, 649-660.
- Lang, W. (1969) Vergleichende Untersuchungen über den Ablauf der Carotinoidsynthese von *Fusarium aqueductum* nach Induktion durch verschiedene Faktoren. Dissertation, Universität München.
- Lockhart, J.A., U. Brodführer-Franzgrote (1961) The effects of ultraviolet radiation on plants. In: W. Ruhland (ed.), *Handbuch der Pflanzenphysiologie XVI*, Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg, pp. 532-554.
- Masinovsky, Z.B. and L.B. Rubin (1976) On the correlation between photoprotection (PP) and photoinhibition (PI) of *Ectothiorhodospira shaposhnikovii*. *Studia Biohysica* **54**, 105-117.
- Mathews-Roth, M.M. and N.I. Krinsky (1970) Studies on the protective function of the carotenoid pigments of *Sarcina lutea*. *Photochem.Photobiol.* **11**, 419-428.
- Mathews-Roth, M.M., T. Wilson, E. Fujimori and N. Krinsky (1974) Carotenoid Chromophore Length And Protection Against Photosensitization.

Photochem.Photobiol. 19, 217-222.

Mathews-Roth, M.M. (1982) Antitumour activity of β -carotene, canthaxanthin and phytoen. Oncology 39, 33-37.

Mathews-Roth, M.M. (1983) Carotenoid Pigment Administration and Delay in Development of UV-B-Induced Tumors. Photochem.Photobiol. 37, 509-511.

Mathews-Roth, M.M. and N.I. Krinsky (1984) Effect of dietary fat level on UV-B induced skin tumours and antitumour action of β -carotene. Photochem.Photobiol. 40, 671-673.

McLaren, A.D. and D. Shugar (1964) Photochemistry of proteins and nucleic acids. Pergamon Press, Oxford.

Miki M., H. Tamai, M.Mino, Y. Yamamoto and E. Niki (1987) Free-Radical Chain Oxidation of Rat Red Blood Cells by Molecular Oxygen and its Inhibition by α -Tocopherol. Archives of Biochem. and Biophys. 258, 373-380.

Mitzka-Schnabel, U. (1978) Intrazelluläre Lokalisation und photoregulierte Biosynthese der Carotinoide in einem zell freien System aus Neurospora crassa. Dissertation, Universität München.

Mitzka-Schnabel, U. und W. Rau (1981) Subcellular site of Carotenoid Biosynthesis in Neurospora crassa. Photochem. 20, 63-69.

Mohr, H., H. Drumm und H. Kasemir (1974) Licht und Farbstoffe. Ber.Deutsch.Bot.Ges. 87, 49-69.

Mohr, H. und P. Schopfer (1978) Lehrbuch der Pflanzenphysiologie, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Molina, M.J., F.S. Rowland (1974) Stratospheric sink for chlorfluoromethane: chlorine atom - catalysed destruction of ozone. Nature 249, 810-812.

Morris, S.A.C. and R.E. Subden (1974) Effects of Ultraviolet Radiation on Carotenoid Containing and Albino Stains of Neurospora crassa. Mutation Res. 22, 105-109.

Morrison, W.R., L.M. Smith (1964) Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from Lipids with boron trifluoride-methanol. J.Lipid Res. 5, 600-608.

Moss, S.H. and K.C. Smith (1981) Membrane damage can be a significant factor in the inactivation of Escherichia coli by near-ultraviolet radiation. Photochem.Photobiol. 33, 203-210.

- Murillo, F.J. and E. Cerda-Olmedo (1976) Regulation of carotene synthesis in *Phycomyces*. *Molec.Gen.Genet.*, **148**, 19-24.
- Murphy, T.M. (1983) Membranes as targets of ultraviolet radiation. *Physiol.Plant* **58**, 381-388.
- National Academy of Science (1984) Causes and effects of changes in stratospheric ozone. Update 1983. National Academy Press, Washington DC.
- Patrick, M.H. and R.D. Rahn (1976) Photochemistry of DNA and polynucleotid Photoproducts. In: "Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids", Vol. II, pp.35-95, S.Y. Wang, ed., Academic Press, New York.
- Peters, J. (1977) In vivo photoinactivation of *Escherichia coli* ribonucleotid reductase by near ultra-violet light. *Nature*, **267**, 546-548.
- Peters, J. and J. Jagger (1981) Inducible repair of near-UV radiation lethal damage in *E.coli*. *Nature* **289**, 194-195.
- Porter, J.W. and R.E. Lincoln (1950) *Lycopersicon* Selections Containing a High Content of Carotene and Colorless Polyenes. II. The Mechanismus of Carotene Biosynthesis. *Arch.Biochem.* **27**,390.
- Rhamabhadran, T.V. (1975) Effects of near-ultraviolet and violet radiations (313-405 nm) on DNA, RNA, and protein synthesis in *E.coli* B/r: Implications for growth delay. *Photochem. Photobiol.* **22**, 117-123.
- Rau, W. und C. Zehender (1959) Die Carotinoide von *Fusarium aquaeductum* Lagerh. *Arch.Mikrobiol.* **32**, 423-428.
- Rau, W. (1962) Über den Einfluß der Temperatur auf die lichtabhängige Carotinoidbildung bei *Fusarium aquaeductum*. *Planta* **59**, 123-137.
- Rau, W. (1967a) Untersuchungen über die lichtabhängige Carotinoidsynthese. I. Das Wirkungsspektrum von *Fusarium aquaeductum*. *Planta* **72**, 14-28.
- Rau, W. (1967b) Untersuchungen über die lichtabhängige Carotinoidsynthese. II. Ersatz der Lichtinduktion durch Mercuribenzoat. *Planta* **74**, 263-277.
- Rau, W., I. Lindemann, A. Rau-Hund (1968) Untersuchungen über die lichtabhängige Carotinoidbiosynthese. III. Die Farbstoffbildung von *Neurospora* in Submerskultur. *Planta* **80**, 309.
- Rau, W. (1969) Untersuchungen über die lichtabhängige Carotinoidsynthese. IV. Die Rolle des Sauerstoffs bei der Lichtinduktion. *Planta* **84**, 30-42.

- Rau, W. (1971) Untersuchungen über die lichtabhängige Carotinoidsynthese. IV. Reversible Unterbrechung der Reaktionskette durch Cycloheximid und anaerobe Bedingungen. *Planta* 101, 251-264.
- Rau, W. (1975) Zum Mechanismus der Photoregulation von Morphosen am Beispiel der Carotinoidsynthese. *Ber.Deutsch.Bot.Ges.* 88, 45-60.
- Rau, W. und A. Rau-Hund (1977) Light-dependent carotenoid biosynthesis. X. Lag-phase after a second illumination period in *Fus. aquaeductuum* und *N. crassa*. *Planta* 136, 49-52.
- Rau, W. (1980) Blue light-induced carotenoid biosynthesis in microorganisms. In "The Blue Light Syndrome, ed. H. Senger, Springer, Berlin Heidelberg New York.
- Rau, W. (1985) Mechanism of photoregulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Pure & Appl.Chem.* 57, 777-784.
- Reger, A. (1988) Untersuchungen zur Aufklärung des UV-Blau-Photoreceptors bei *Neurospora crassa*. Dissertation, Universität München.
- Robb, F.T., J.H. Hauman, and M.J. Peak (1978) Similar spectra for the inactivation by monochromatic light of two distinct leucine transport systems in *Escherichia coli*. *Photochem.Photobiol.*, 27, 465-469.
- Robb, F.T. and M.J. Peak (1979) Inactivation of lactose permease of *Escherichia coli* by monochromatic ultraviolet light. *Photochem.Photobiol.* 30, 379-383.
- Robberecht, R and M.M. Caldwell (1980) Leaf ultraviolet optical properties along a latitudinal gradient in the arctic-alpine life zone. *Ecology* 61, 612-619.
- Roth, S. (1983) Optimierung und Anwendung der computergetützten Mehrkomponentenanalyse für natürliche Carotinoidgemische. Zulassungsarbeit, Universität München.
- Rouser, G., S. Fleischer (1967) Isolation, Characterization and Determination of Polar Lipids of Mitochondria. In *Methods in Enzymology*", 10, ed. R.W. Estabrook and M.E. Pullman, 385-406.
- Rowland, F.S. (1982) Possible anthropogenic influences on stratospheric ozone. In: the of solar ultraviolet radiation in marine ecosystems. Calkins, J., ed., Plenum Press New York.
- Santamaria, L., A. Bianchi, L. Bianchi, R. Pizzala, L. Andreoni, S. Santagati, P. Bermond (1985) Carotenoids Prevent Benzo(a)pyrene (BP), 8-Methoxypsoralen (8-MOP) Photocarcinogenesis,

And 8-MOP Photomutagenesis. Relevance in Social Medicine and PUVA therapy. IN: Book Of Abstracts, 7th International Symposium on Carotenoids, Munchen, p.22.

Schnarrenberger, C. and H. Mohr (1970) Carotenoid synthesis in mustard seedlings as controlled by phytochrome and inhibitors. *Planta* **94**, 296-307.

Schrott, E.L. and W. Rau (1977) Evidence for a photoinduced synthesis of poly (A) containing mRNA in *Fusarium aquaeductum*. *Planta* **136**, 45-48.

Schrott, E.L. (1980) Fluence response relationship of carotenogenesis in *Neurospora crassa*. *Planta* **150**, 174-179.

Schrott, E.L., A. Huber-Willer and W. Rau (1982) Is Phytochrome Involved In The Light-Mediated Carotenogenesis In *Fusarium Aquaeductum* And *Neurospora Crassa*? *Photochem.Photobiol.* **35**, 213-216.

Schrott, E.L. and P. Jochum (1984) Deconvolution of Multi-component Ultraviolet/Visible Spectra. *Analytica Chimica Acta* **157**, 211-226.

Schrott, E.L. (1985) Carotenoids in plant photoprotection. *Pure Appl.Chem.* **57**, 729-734.

Senger, H. and W.R. Briggs (1981) The blue light receptor(s): Primary reactions and subsequent metabolic changes. In: *Photochemical and Photobiological Reviews*, VI, K.C. Smith (ed.), Plenum Press, New York, pp. 1-39.

Sharma, R.C. and J. Jagger (1981) Ultraviolet (254-405nm) action spectrum and kinetic studies of alanine uptake in *Escherichia coli* B/r. *Photochem.Photobiol.* **33**, 173-177.

Shropshire, W. (1980) Carotenoids as Primary Photoreceptors in the Blue-Light Responses. In: "The Blue Light Syndrome". Senger H. (ed.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 173-186.

Song, P.S. (1980) : Spectroscopic and Photochemical Characterization of Flavoproteins and Carotenoproteins as Blue Light Photoreceptors. In: "The Blue Light Syndrome", Senger H. (ed.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 157-276.

Sprott, G.D., K. Dimock, W.G. Martin, and H. Schneider (1976) Coupling of glycine and alanine transport to respiration in cells of *Escherichia coli*. *Canad.J.Biochem.* **53**, 262-268.

- Steinmüller, D. and M. Tevini (1985) Action of ultraviolet radiation (UV-B) on cuticular waxes in some crop plants. *Planta*, **164**, 557-564.
- Stryer, L. (1981) *Biochemistry*, Library of Congress Cataloging in Publication Data.
- Swenson, P.A., J.E. Ives and R.L. Schenley (1975) Photo-protection of *E.coli* B/r: Respiration, growth, macromolecular synthesis and repair of DNA. *Photochem.Photobiol.* **21**, 235-241.
- Tanaka, T., Y. Suda, N. Kondo and K. Sugahara (1985) O₃ Tolerance and the Ascorbate-Dependent H₂O₂ Decomposing System in Chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* **26**, 1425-1431.
- Tang, M.-S. and M.H. Patrick (1977) The role of DNA polymerase I in liquid holding recovery of UV-irradiated *Escherichia coli*. *Photochem.Photobiol.* **26**, 257-267.
- Tevini, M. und W. Iwanzik (1982) Untersuchungen über den Einfluß erhöhter UV-B-Strahlung auf Entwicklung, Zusammensetzung, Struktur und Funktion von Pflanzen. BPT-Bericht 1, Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, München.
- Theimer, R.R. (1968) Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von Licht und Mercuribenzoat bei der Carotinoidsynthese in *Fusarium aquaeductum*. Dissertation, Universität München.
- Theimer, R.R. und W. Rau (1970) Untersuchungen über die Licht abhängige Carotinoidsynthese. V. Aufhebung der Lichtinduktion durch Reduktionsmittel und Ersatz des Lichtes durch Wasserstoffperoxid. *Planta* **92**, 129-137.
- Thomas, S.A., M.L. Sargent, and R.W. Tuveson (1981) Inactivation of normal ¹O₂, carotenoid composition, and sensitizer location. *Photochem.Photobiol.* **33**, 349-354.
- Tyrell, R.M. (1973) Induction of pyrimidine dimers in bacterial DNA by 365nm radiation. *Photochem.Photobiol.* **17**, 69-73.
- Tyrell, R.M. (1979a) Lethal cellular changes induced by near-ultraviolet radiation. *Act.Biol.Med.Germ.* **38**, 1259-1269.
- Webb, R.B. (1977) Lethal and mutagenic effect of near-ultraviolet radiation. *Photochemical and Photobiological Reviews* **2**, 169-261. K.C. Smith, ed., Plenum Press, New York.

Wellmann, E. (1975) UV dose-dependent induction of enzymes related to flavonoid biosynthesis in cell suspension cultures of parsley. FEBS Letters 51, 105-107.

Wellmann, E., U. Schneider-Ziebert and C.J. Beggs (1984) UV-B inhibition of phytochrom-mediated anthocyanin formation in *Sinapis alba* L. cotyledons. Action spectrum and the role of photoreactivation. Plant Physiol. 75, 997-1000.

Wellmann E., C. Beggs, B. Möhle, U. Schneider-Ziebert, V. Steinmetz und U. Koch (1986) UV-B-Wirkungen auf Pflanzen: Schädigungs-Wirkungsspektren, Primärschäden und UV-Schutzmechanismen. BPT-Bericht 4, Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, München.

Meinem Lehrer Herrn Prof. Dr. W. Rau möchte ich an dieser Stelle ganz besonders danken für die Überlassung dieses interessanten Themas, für seine unermüdliche Unterstützung in allen wissenschaftlichen und persönlichen Belangen, für den stets vorhandenen Rückhalt und seine unzähligen wertvollen Ratschläge und Diskussionen.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. E.L. Schrott für die vielen aufschlußreichen Diskussionen und wichtigen Tips.

Frau Dr. A. Rau-Hund möchte ich ganz herzlich für die Bereitstellung der Mutanten danken, für wichtige Hinweise und Informationen.

Danken möchte ich auch Frau E. Seigner und Frau A. Reger für informative Gespräche und praktische Hilfe.

Frau A. Hesse danke ich besonders für die gewissenhafte Assistenz bei einem Großteil der Versuche und für die harmonische Kooperation,

sowie Frau D. Sensburg für ihre Hilfe bei einigen Versuchen und dem gesamten Arbeitskreis von Herrn Prof. Rau für die langjährige und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Herrn G. Henkelmann möchte ich meinen Dank aussprechen für die Einarbeitung in die Techniken der Lipidanalyse und die Durchführung der gaschromatographischen Fettsäureanalysen.

Und nicht zuletzt danke ich Frau J. Seifert für die Anfertigung der Zeichnungen.

Lebenslauf

Luitgardis Martina Maria Seigner

geboren am: 25. November 1957

Geburtsort: Landshut

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

1964-1968 Volksschule in Seifriedswörth

1968-1977 Neusprachliches Gymnasium in Landshut

1977 Reifeprüfung

1977 Beginn des Studiums der Biologie an der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Juni 1980 Diplom-Vorprüfung

1983-1984 Diplomarbeit

Juni 1984 Diplom-Hauptprüfung

Hauptfach: Physiologische Botanik

Nebenfächer: Mikrobiologie

Biochemie

Juni 1984 Beginn der Dissertation bei Prof. Dr. W. Rau
am Botanischen Institut der Universität München

1983-1988 Beschäftigung als Wissenschaftliche Hilfskraft
am Botanischen Institut und Praktikumsassistentin

